

NMR-Spektroskopie an Lipoproteinen und Lipoproteinsubklassen



DISSERTATION ZU ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Daniela Baumstark

aus

Regensburg

im Jahr 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

21.11.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Unterschrift:

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt



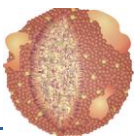
Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS...

<u>1</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>EINFÜHRUNG</u>	<u>4</u>
<u>2.1</u>	<u>FUNKTION, ZUSAMMENSETZUNG UND ANALYSE VON BLUT</u>	<u>4</u>
<u>2.2</u>	<u>KLASSIFIZIERUNG VON LIPIDEN UND VORKOMMEN IM MENSCHLICHEN KÖRPER</u>	<u>7</u>
<u>2.3</u>	<u>LIPOPROTEINE</u>	<u>11</u>
2.3.1	KLASSIFIZIERUNG, STRUKTUR UND ZUSAMMENSETZUNG	11
2.3.2	METABOLISMUS	15
2.3.3	ANALYSE VON LIPOPROTEINEN	18
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>22</u>
<u>3.1</u>	<u>PUFFER</u>	<u>24</u>
3.1.1	PBS-PUFFER	24
3.1.2	EXTRAZELLULÄRER PUFFER	24
<u>3.2</u>	<u>PROBENPRÄPARATION</u>	<u>24</u>
3.2.1	FRAKTIONIERUNG VON SERUM DURCH SEQUENTIELLE ULTRAZENTRIFUGATION	25
3.2.2	FRAKTIONIERUNG VON SERUM DURCH DICHTEGradienten-ULTRAZENTRIFUGATION	26
3.2.3	SUBFRAKTIONIERUNG VON HDL DURCH DICHTEGradienten-ULTRAZENTRIFUGATION	27
3.2.4	SUBFRAKTIONIERUNG DER LIPOPROTEINE DURCH GELFILTRATION	27
3.2.5	EXTRAKTION	28
<u>3.3</u>	<u>NMR-SPEKTROSKOPIE</u>	<u>28</u>
3.3.1	ALLGEMEINES	28
3.3.2	T ₁ -MESSUNGEN DURCH INVERSION RECOVERY	29
3.3.3	T ₂ -MESSUNGEN DURCH SPIN-ECHO	30
3.3.4	BERECHNUNG VON DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN UND DARAUS RESULTIERENDER MOLARER Massen UND RADIIEN	30
3.3.5	HANDHABUNG EXTRAHIERTER PROBEN	33
3.3.6	HOCHDRUCK-MESSUNGEN	33
<u>3.4</u>	<u>ANALYSETECHNIKEN</u>	<u>34</u>
3.4.1	TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	34
3.4.2	GELELEKTROPHORESE	35

<u>3.5</u>	<u>AUSWERTUNG</u>	<u>36</u>
3.5.1	BERECHNUNGEN MIT MATLAB	36
3.5.2	FEHLERRECHNUNG BEI FITFUNKTIONEN	36
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>37</u>
<u>4.1</u>	<u>QUANTITATIVE ANALYSE DER LIPOPROTEINE IN SERUM</u>	<u>37</u>
4.1.1	FRAKTIONIERUNG VON SERUM UND ANSCHLIEßENDE RÜCKFORMIERUNG DER ORIGINALPROBE	41
4.1.2	EXTRAKTION	44
4.1.2.1	Methode zur Quantifizierung der Lipide in den extrahierten Proben	45
4.1.2.2	Bestimmung der T_1 -Zeiten der extrahierten Lipide	52
4.1.2.3	Zuordnung der NMR-Signale der extrahierten Lipide	54
4.1.2.4	Zusammensetzung der Lipide in den extrahierten Lipoproteinfractionen	59
4.1.2.5	Vergleich der Lipoproteine mit den daraus extrahierten Lipiden	62
4.1.3	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	65
4.1.4	MATHEMATISCHE FRAKTIONIERUNG VON SERUM	71
4.1.5	KLINISCHE DATEN	76
4.1.6	ZUSAMMENFASSUNG	76
<u>4.2</u>	<u>STRUKTUREVALUATION DER LIPOPROTEINKLASSEN</u>	<u>81</u>
4.2.1	TEMPERATURABHÄNGIGE NMR-SPEKTROSKOPIE AN SERUM UND LIPOPROTEINEN	83
4.2.2	DRUCKABHÄNGIGE NMR-SPEKTROSKOPIE AN SERUM	101
<u>4.3</u>	<u>AUF DER SUCHE NACH APOLIPOPROTEIN-SIGNALEN IN NMR-SPEKTREN VON LIPOPROTEINEN UND SERUM</u>	<u>106</u>
<u>4.4</u>	<u>VERGLEICH VERSCHIEDENER SEPARATIONSMETHODEN VON LIPOPROTEINEN</u>	<u>114</u>
4.4.1	SUBFRAKTIONIERUNG VON HDL	114
4.4.1.1	Einfluss der Konzentration in HDL-Proben	117
4.4.1.2	Einfluss des pH-Wertes in HDL-Proben	123
4.4.1.3	NMR-spektroskopische Untersuchungen von HDL-Subfraktionen	124
4.4.2	SUBFRAKTIONIERUNG VON SERUM	133
4.4.2.1	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in einem Schritt	133
4.4.2.2	Gelfiltration von gesamtem Serum	137
<u>4.5</u>	<u>UNTERSUCHUNG VON BOVINEM SERUM</u>	<u>142</u>
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>148</u>
<u>5.1</u>	<u>QUANTITATIVE ANALYSE DER LIPOPROTEINE IN SERUM</u>	<u>148</u>

5.1.1	QUANTIFIZIERUNG DER LIPOPROTEINE MITTELS NMR	148
5.1.2	LIPIDZUSAMMENSETZUNG DER LIPOPROTEINE	149
5.1.3	SICHTBARKEIT DER LIPIDE IN NMR-SPEKTREN VON LIPOPROTEINEN	151
5.1.4	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	151
5.1.5	QUANTIFIZIERUNG DER LIPOPROTEINKLASSEN AN DIFFUSIONSGEWICHTETEN NMR-SPEKTREN	151
5.1.6	ÜBERBLICK ÜBER DIE QUANTITATIVEN ANALYSEMÖGLICHKEITEN DER LIPOPROTEINE	152
5.1.7	ANALYSE DER APOLIPOPROTEINSIGNALE	153
5.2	<u>EVALUATION DER LIPOPROTEINSTRUKTUR</u>	<u>154</u>
5.2.1	VLDL	154
5.2.2	LDL	155
5.2.3	HDL2	157
5.2.4	VERGLEICH DER TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER LIPOPROTEINE	158
5.2.5	SERUM	159
5.2.6	BOVINE LIPOPROTEINE	159
5.3	<u>METHODIK DER LIPOPROTEINSEPARATION</u>	<u>161</u>
5.3.1	ISOLIERUNG DER LIPOPROTEINE AUS SERUM	161
5.3.2	ISOLIERUNG VON HDL-SUBFRAKTIONEN	162
6	<u>LITERATUR</u>	<u>166</u>
7	<u>ANHANG</u>	<u>177</u>
7.1	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>177</u>
7.2	<u>CHEMISCHE VERSCHIEBUNG ALLER SIGNALE NACH EXTRAKTION AUS KAPITEL 4.1.2</u>	<u>178</u>
7.3	<u>MATLAB-QUELLCODES</u>	<u>184</u>
7.3.1	KOMPONENTENANALYSE AUS KAPITEL 4.1.1	184
7.3.2	BERECHNUNG DER T_1 -ZEITEN AUS KAPITEL 4.1.2	185
7.3.3	FITTEN DES DIFFUSIONSABFALLS AUS KAPITEL 4.4.1	186
7.3.4	FITTEN DES DIFFUSIONSABFALLS FÜR DEFINIERTE DIFFUSIONS KONSTANTEN AUS KAPITEL 4.1.4	187
7.3.5	BERECHNUNG DER T_2 -ZEITEN AUS KAPITEL 4.2	189
8	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>192</u>



1 ZUSAMMENFASSUNG..

Lipoproteine stehen als Risikofaktoren für Herz-Kreislauferkrankungen hoch im Fokus des medizinischen Interesses. Strukturelle Veränderungen in LDL können nach heutigem Kenntnisstand zur Ausbildung von Arteriosklerose führen, aber auch das Verhältnis von besonders kleinen HDL oder LDL im Vergleich zu den jeweils größeren Partikeln hat entscheidenden Einfluss auf das Risiko zu erkranken. Zum Verständnis der genauen Mechanismen sind Informationen über Aufbau und Zusammensetzung der Lipoproteine notwendig, welche noch nicht vollständig geklärt sind. Akkurate und effektive Analyseverfahren sind zudem unabdingbar und können zu geeigneten Präventionsmaßnahmen verwendet werden.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie als nicht invasive Methode neue Erkenntnisse über den Aufbau und die Zusammensetzung von Lipoproteinen erzielt. Detaillierte Untersuchungen von eindimensionalen NMR-Spektren führten zu einem besseren Verständnis der Kurvenform, wodurch auch erste Erkenntnisse über die Struktur von bovinen Lipoproteinen möglich waren. Des Weiteren wurden diverse Methoden zur Isolierung und Quantifizierung der Lipoproteinklassen analysiert und miteinander verglichen.

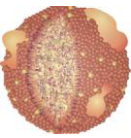
Ein großer Teilaspekt galt der Evaluierung und Optimierung von Quantifizierungsmethoden. Dazu wurden aus einer Serumprobe eines gesunden Spenders die gängigen Lipoproteinsubklassen und zwei Serumprotein-Fraktionen isoliert. Aliquots dieser Proben wurden zum einen NMR-spektroskopisch, aber auch über enzymatische Analysen zur Cholesterinbestimmung und elektronenmikroskopische Untersuchungen charakterisiert. Es wurde zudem eine Methode etabliert, mit der über einen einfachen Extraktionsschritt und die Messung eines kurzen NMR-Experiments eine quantitative Aussage über die gesamte Lipidverteilung in Serum und den Lipoproteinen erhalten wurde. Über Linearkombination von NMR-Spektren konnte aus den Einzelspektren wieder das ursprüngliche Serumspektrum simuliert werden, was zu einer relativen Verteilung der Lipoproteinklassen und Proteinanteile führte. Methodisch ähnlich wurde über die relativen Diffusionskoeffizienten der isolierten Proben das Diffusionsverhalten von Serum studiert, was ebenfalls zu einer Aussage über die relative Verteilung führte. Durch geeignete Kombination der einzelnen Analysen war letztendlich eine

gesamte Beschreibung der Lipid- und Lipoprotein-Zusammensetzung, sowie die Angabe einer ungefähren Konzentration von LDL und HDL in Serum möglich.

Ein weiterer Teilaspekt galt den NMR-Studien derselben Proben unter dem Einfluss von unterschiedlichen Temperaturen und unter Hochdruck. Bei sämtlichen Bedingungen wurden T_2 -Messungen zur Mobilität der einzelnen zu den Spektren beitragenden Signale angefertigt, welche auf die Beweglichkeit einzelner Lipide in den Partikel schließen ließen. Dabei wurden bekannte Phasenübergänge sowohl im Inneren der Partikel als auch in der Membran erkannt, aber auch eine weitere strukturelle Änderung, die zu einem signifikanten Signalabfall der Methylengruppen bei hohem Druck führte. Anhand dieser Informationen konnten zusätzlich strukturelle Aussagen über die Beschaffenheit von bovinen Lipoproteinen gemacht werden. Sowohl bovines LDL als auch HDL zeigten weniger dicht gepackte Strukturen. Bovines LDL lag außerdem im Vergleich zu HDL in einer sehr einheitlichen Größe vor.

Ein besonderes Augenmerk galt ferner dem Vergleich der Ultrazentrifugation und der Gelfiltration als Trennmethode zur Isolierung von Lipoproteinklassen und -subklassen. Zum einen wurde vorab isoliertes HDL2 und HDL3 jeweils mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und Gelfiltration subfraktioniert und über Gelelektrophorese und NMR-Spektroskopie untersucht. Um äußere Einflüsse möglichst gering zu halten, wurden dazu Studien über die Wirkung der Konzentration und des pH-Wertes auf die Spektrenform durchgeführt. Während der pH-Wert nur einen sehr geringen Effekt zeigte, konnten abhängig von der Konzentration der Probe chemische Verschiebungen und veränderte Diffusionseigenschaften beobachtet werden, so dass die Konzentrationen der HDL-Subfraktionen vorsorglich aneinander angeglichen wurden. Es ließ sich schließlich anhand von Diffusionsmessungen zeigen, dass sowohl die molaren Massen als auch die hydrodynamischen Radien der Partikel bezüglich der Separationsmethode differierten und für gelfiltrationsgetrennte Proben auch deutlich kleinere Partikel gefunden wurden. Die chemische Verschiebung hingegen wies für diese Subfraktionen eine geringere Streuung auf als für solche, die mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation separiert wurden.

Auch die präparative Isolierung von Lipoproteinen aus gesamtem Serum wurde durchgeführt und durch NMR-spektroskopische Messungen analysiert. Während mit der sequenziellen



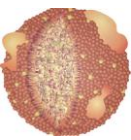
Ultrazentrifugation eine klare Lipoproteintrennung erreicht wurde, konnte eine Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in einem Schritt weniger dichte Partikel nicht effektiv isolieren. Eine neu entwickelte Methode, die auf der Aneinanderreihung von bis zu fünf Gelfiltrations-Säulen beruht, konnte eine respektable Trennleistung erzielen, jedoch wurden leichte Verunreinigungen durch Lipoproteine anderer Größen detektiert.

2 EINFÜHRUNG...

2.1 FUNKTION, ZUSAMMENSETZUNG UND ANALYSE VON BLUT

Das Blut ist ein ‚flüssiges Organ‘, das im menschlichen Körper als geschlossenes Konvektionssystem, dem Kreislauf, zirkuliert. Dabei nimmt es bei Frauen etwa 7%, bei Männern 8% des Gesamtvolumens an Körperflüssigkeit ein. Es wird vom Herzen durch das Gefäßsystem in alle Gewebe gepumpt und stellt so eine stetige Verbindung zwischen diesen her. Es fungiert als Träger von Nährstoffen, die im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Diese werden in gelöster Form oder gebunden an Transportproteine über die Pfortader hin zur Leber transportiert und von dort aus in die peripheren Gewebe verteilt. Umgekehrt werden auch Stoffwechselendprodukte über den Blutkreislauf zu den Ausscheidungsorganen Niere, Lunge, Haut und Darm bewegt. Insbesondere werden die Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid effektiv und schnell zu allen Organen und zurück zur Lunge gebracht, sowie zahlreiche Metaboliten und extrazelluläre Botenstoffe zu ihrem Bestimmungsort. Im Blut befinden sich außerdem die für die Abwehrreaktion von körperfremden Organismen und Verbindungen benötigten Zellen, und Komponenten, die im Verletzungsfall für die Blutgerinnung verantwortlich sind. Zusätzliche Funktion ist die Regulation des Wasserhaushalts und der Körpertemperatur und die Aufrechterhaltung eines stabilen pH-Wertes von 7.4¹⁻⁵.

Ein erwachsener Mensch besitzt durchschnittlich 5-6 Liter Blut. Etwa die Hälfte davon machen zellulären Bestandteile aus. Der flüssige Anteil, auch Blutplasma genannt, besteht zu 90% aus Wasser und zu etwa 10% aus gelösten Stoffen. Die zellulären Bestandteile nennt man Blutkörperchen. Diese unterscheidet man in 3 Hauptgruppen, die Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten, wobei die Erythrocyten mengenmäßig unangefochten dominieren (Abb. 2.1). Sie werden auch rote Blutkörperchen genannt, da sie mit dem roten Farbstoff Hämoglobin ausgestattet sind und Sauerstoff, aber auch Kohlendioxid und Stickoxid binden. Spezifische Antigene an ihrer Oberfläche sorgen für die Unterteilung in die verschiedenen Blutgruppen. Durch den Kontakt mit körperfremden Antikörpern kommt es folglich zur Agglutination der Erythrocyten. Leukocyten, oder auch weiße Blutkörperchen, sind eine heterogene Klasse von Blutzellen. Sie dienen im Wesentlichen der Immunabwehr von Fremdorganismen und Antigenen. Thrombocyten dagegen sorgen im Zuge der Hämostase



(Blutgerinnung) für einen zügigen Gefäßverschluss bei Verletzungen, indem sie sich an das geschädigte Endothel anlagern und so die Blutung stillen.

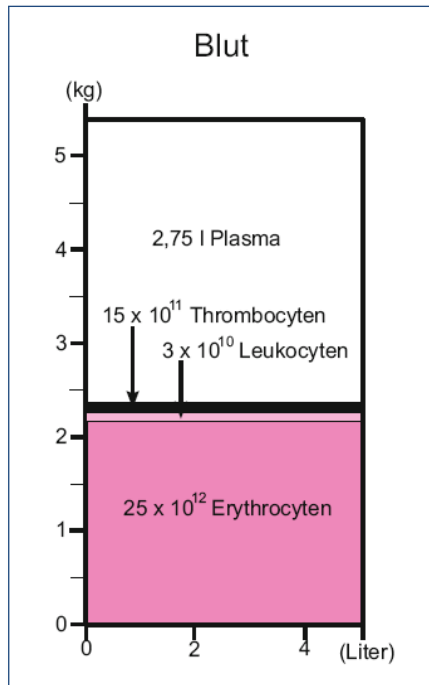


Abb. 2.1: Zusammensetzung des Blutes¹

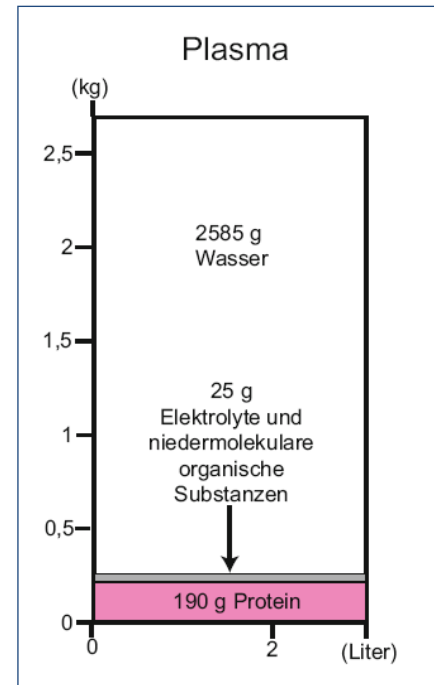


Abb. 2.2: Zusammensetzung des Blutplasmas¹

Blutplasma besteht zum größten Teil aus Wasser, in dem hauptsächlich hochmolekulare Substanzen wie Proteine und Lipoproteine, aber auch niedermolekulare Substanzen wie Elektrolyte, Zucker oder Aminosäuren gelöst sind (Abb. 2.2). Die unzähligen Proteine kann man traditionell mit Hilfe der Trägergelelektrophorese in fünf verschiedene Fraktionen untergliedern, nämlich Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline (Abb. 2.3). Funktionell findet man darunter hauptsächlich Proteine, die an Immunantwort, Blutgerinnung oder Fibrinolyse beteiligt sind, und Transportproteine. Letztere befördern andere Proteine oder schlecht wasserlösliche Substanzen wie Vitamine, Steroidhormone und Lipide. Wichtigster und vor allem häufigster Vertreter dieser Gruppe ist Albumin, man findet aber auch Transportproteine unter den Globulinen.

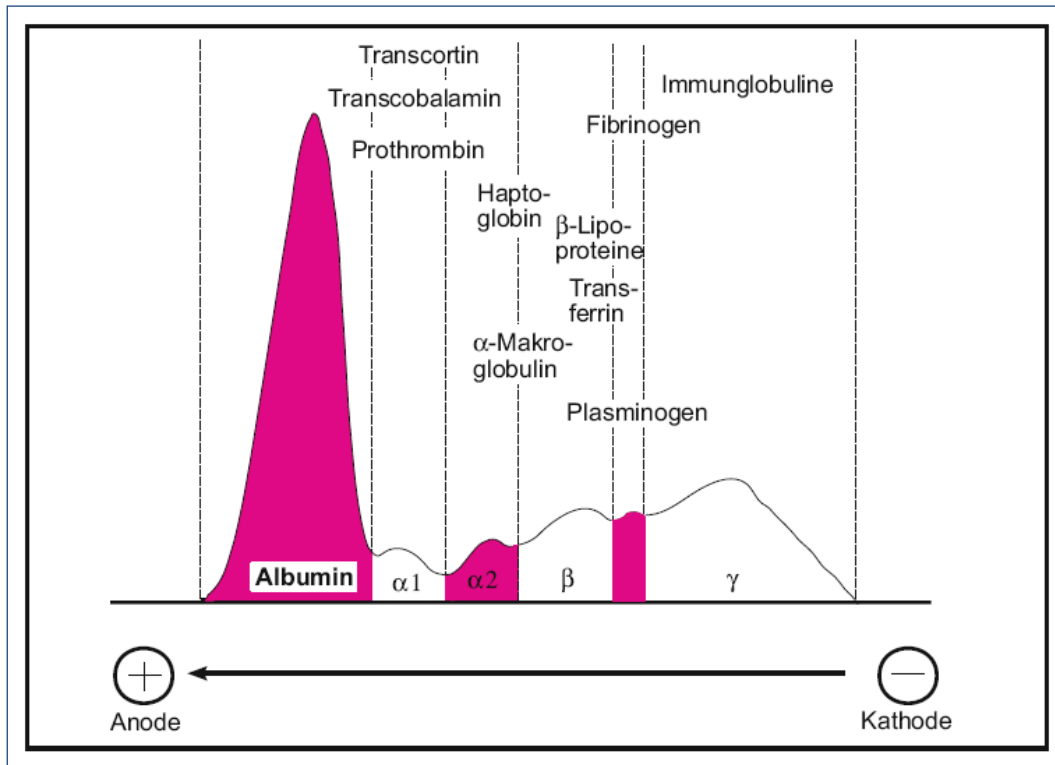
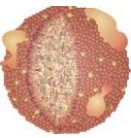


Abb. 2.3: Elektropherogramm der Plasmaproteine¹

Lipide werden im Allgemeinen in mehr oder weniger globuläre wasserlösliche Aggregate, die Lipoproteine, verpackt, die mit Hilfe von Apolipoproteinen in Form gehalten werden. Die Einteilung der Lipoproteine anhand der elektrophoretischen Laufeigenschaften ist auch heute noch verbreitet, so wird HDL den α_1 -Globulinen zugeordnet und LDL den β -Globulinen. VLDL und IDL werden üblicherweise mit prä- β bezeichnet, da sie nahe der β -Globulin-Bande laufen^{1, 3-4}.

Im Blut befinden sich Nährstoffe, Metaboliten und entsorgungspflichtige Verbindungen, deren Konzentration mit der Funktion und Aktivität spezieller Organe korreliert. Aufgrund zahlreicher Studien kann man heute auf einen breiten Katalog aus Normwerten für die unterschiedlichsten Blutkomponenten zugreifen. Auffällige Abweichungen von diesen Werten erlauben Rückschlüsse auf Fehlfunktionen oder Krankheiten, die nach einer gründlichen Prognose entsprechend behandelt werden können⁶.

Um die Blutbestandteile eingehend untersuchen zu können, muss man sicherstellen, dass die Analysen reproduzierbar sind und keine systematischen Fehler aufweisen. Insbesondere muss man gewährleisten, dass das Blut nach der Entnahme und während der Analyse intakt bleibt und sich die



Konzentrationen der Einzelbestandteile nicht ändern. Dazu wird beispielsweise eine unkontrollierte Blutgerinnung unterbunden, indem man entweder Gerinnungshemmer wie EDTA oder Citrat zusetzt oder das Vollblut gänzlich gerinnen lässt und anschließend vom Überstand separiert. Bei der ersten Variante wird durch Komplexierung des Gerinnungsfaktors Ca^{2+} zu einem unlöslichen Chelatkomplex die Gerinnungskaskade unterbrochen. Folglich verbleiben die übrigen Gerinnungsfaktoren im Plasma. Die zellulären Bestandteile müssen durch Zentrifugation separat abgetrennt werden. Alternativ entsteht durch vollständiges Gerinnen der Blutprobe der sogenannte Blutkuchen aus roten Blutkörperchen, Blutplättchen und Fibrin. Den Überstand, der frei von Fibrinogen ist, nennt man nun nicht mehr Plasma, sondern Serum. Sowohl Serum als auch Plasma besitzen eine schwach gelbe Farbe, die aus dem Hämoglobin-Abbauprodukt Bilirubin resultiert^{1, 6}.

Im Labor stehen nun spektroskopische, elektrochemische, immunologische oder simple Zellzählverfahren zur Verfügung, mit deren Hilfe man eine Fülle von Metaboliten charakterisieren und quantifizieren kann. Spezielle Analysen verlangen allerdings vorherige Trennschritte, die das Blutserum in entsprechende Fraktionen zerlegen oder störende Komponenten beseitigen⁶.

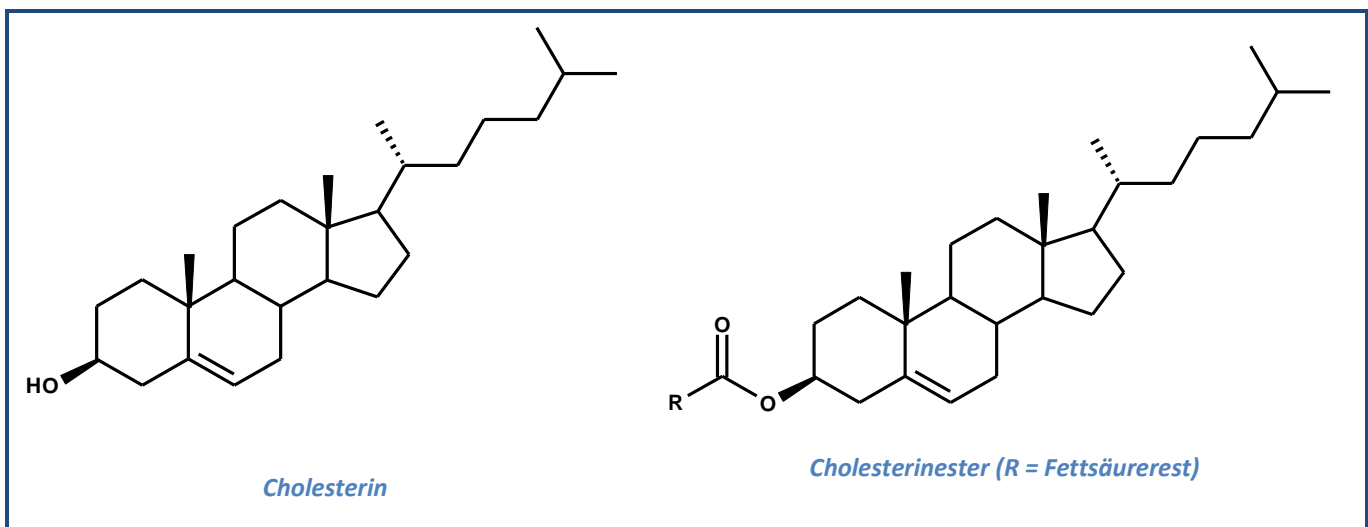
2.2 KLASSIFIZIERUNG VON LIPIDEN UND VORKOMMEN IM MENSCHLICHEN KÖRPER

Lipide sind eine sehr heterogene Klasse organischer Moleküle, die einzig ihre Unlöslichkeit in Wasser gemein haben. In organischen Lösungsmitteln wie Chloroform hingegen können sie vollständig aufgelöst werden. Einige Vertreter der Lipide besitzen allerdings Grenzflächenaktivität, was durch ihren amphiphilen Charakter mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Ende zustande kommt. Fettsäurederivate machen einen großen Teil der Lipide aus, weshalb man grundsätzlich verseifbare und nicht verseifbare Lipide unterscheidet (Abb. 2.4). Verseifung bezeichnet die chemische Esterhydrolyse, die die Fettsäure und den entsprechenden Alkohol freisetzt⁷.

Nicht verseifbare Lipide			Verseifbare (zusammengesetzte) Lipide			
Fettsäuren und Derivate	Isoprenderivate		Acylreste	Verestert mit	Weitere Komponenten	Bezeichnung
	Terpen	Steroid				
Fettsäuren Eikosanoide (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene)	Retinol Phyllochinone Tocopherol Dolichol	Cholesterin Steroidhormone D-Vitamine Gallensäuren	1	Langkettigen Alkoholen	–	Wachse
			1–3	Glycerin	–	Acylglycerine
			1–2	Glycerin-3-Phosphat	Serin, Ethanolamin, Cholin, Inositol	Phosphoglyceride
			1	Sphingosin	Phosphorylcholin, Galaktose, Oligosaccharide	Sphingolipide
			1	Cholesterin	–	Cholesterinester

Abb. 2.4: Klassifizierung der Lipide⁴

Zu der Klasse der einfachen nicht verseifbaren Lipide zählen im Wesentlichen freie Fettsäuren, Gallensäuren und Cholesterin, sowie einige Hormone und Vitamine. Die verseifbaren Lipide kann man nach dem jeweils gebundenen Alkohol in fünf Gruppen gliedern. Abgesehen von den Wachsen, die im menschlichen Körper nicht vorkommen, findet man Acylglyceride, Phosphoglyceride, Sphingolipide und Cholesterinester (Abb. 2.5)⁴.



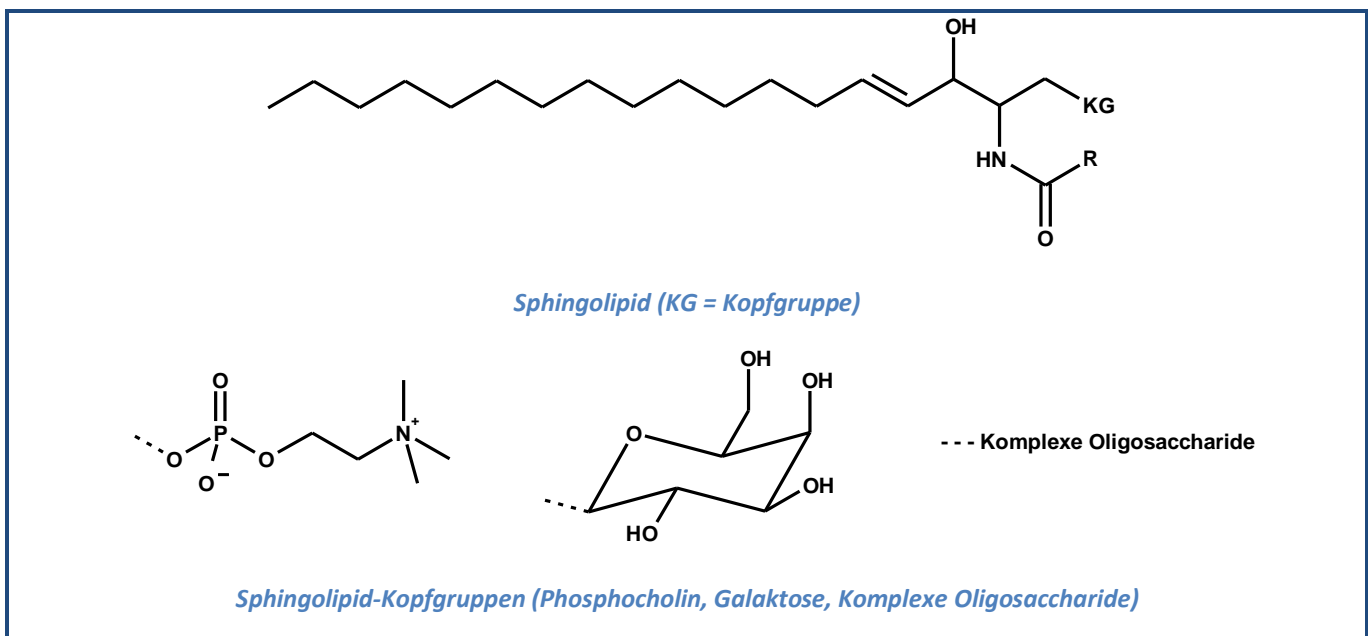
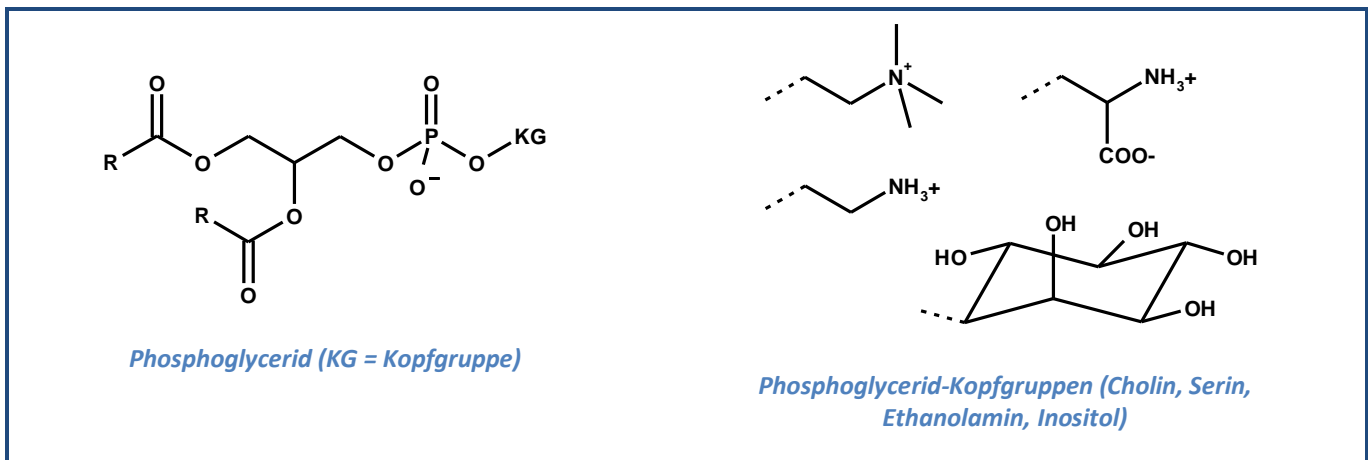
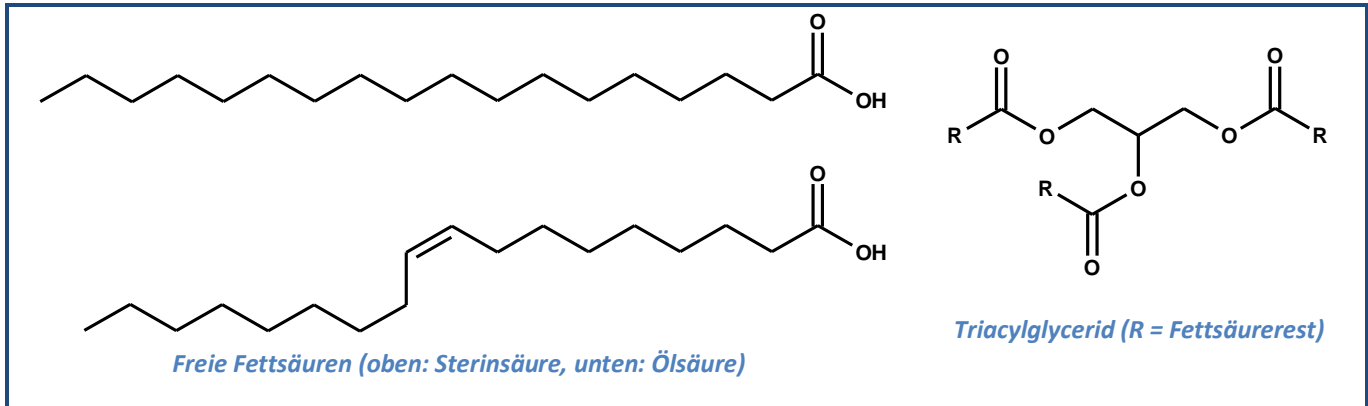
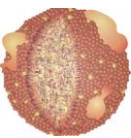


Abb. 2.5: Moleküldarstellung der gängigen Lipidvertreter im menschlichen Organismus

Fettsäuren bestehen aus einer langen Kohlenstoffkette, die an einem Ende eine Carboxylgruppe trägt. Überwiegend sind sie unverzweigt und besitzen eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen, außerdem

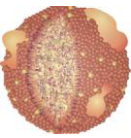
können sie an einer oder mehreren Stellen Doppelbindungen aufweisen, die üblicherweise durch eine CH_2 -Gruppe getrennt und in cis-Konformation vorliegen. Da unser Körper nicht in der Lage ist, Doppelbindungen zu synthetisieren, die von der Säuregruppe mehr als 9 Kohlenstoffatome entfernt sind, müssen diese sogenannten essentiellen Fettsäuren mit der Nahrung zugeführt werden (Abb. 2.6) 4, 7-8.

Trivialname	Chemischer Name	Formel	Vorkommen
Gesättigte Fettsäuren: Summenformel $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{COOH}$			
Myristinsäure	Tetradecansäure	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	Anker für Membranproteine
Palmitinsäure	Hexadecansäure	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	Bestandteil tierischer und pflanzlicher Lipide
Stearinsäure	Octadecansäure	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	Bestandteil tierischer und pflanzlicher Lipide
Lignocerinsäure	Tetracosansäure	$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$	Bestandteil der Cerebroside und Sphingomyeline
Einfach ungesättigte Fettsäuren: Summenformel $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{COOH}$			
Palmitoleinsäure	cis- Δ^9 -Hexadecensäure	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$	In Milchfett und Depotfett, Bestandteil der Pflanzenöle
Ölsäure	cis- Δ^9 -Octadecensäure	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	Hauptbestandteil aller Fette und Öle
Nervonsäure	cis- Δ^{15} -Tetracosensäure	$\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_2$	In Cerebrosiden
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren			
Linolsäure ^a	$\Delta^{9,12}$ -Octadecadiensäure	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	In Pflanzenölen und Depotfett
Linolensäure ^a	$\Delta^{9,12,15}$ -Octadecatriensäure	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	In Fischölen
Arachidonsäure	$\Delta^{5,8,11,14}$ -Eikosatetraensäure	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	In Fischölen, Bestandteil vieler Phosphoglyceride
^a Essentielle Fettsäuren (Kap. 20.1.2).			

Abb. 2.6: Auswahl einiger wichtiger Fettsäuren⁴

Fettsäuren dienen neben Kohlenhydraten als wichtigster Energielieferant und liegen im Allgemeinen nicht in freier Form sondern gebunden an Proteine oder verestert mit diversen Alkoholen vor. Glycerin, zum Beispiel, kann als dreiwertiger Alkohol bis zu drei Fettsäuren binden (Mono- Di- oder Triacylglyceride). Triacylglyceride werden im Fettgewebe gespeichert, das normalerweise etwa 12% des Körpergewichtes ausmacht, man findet sie aber auch in Lipoproteinen, da Fettsäuren in dieser Form im Blut transportiert werden.

Wird eine der äußeren Fettsäuren eines Triacylglycerids durch eine Phosphatgruppe ersetzt erhält man sogenannte Phosphatide, die wiederum über eine Esterbindung an Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol verknüpft sein können (Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin oder -inositol). Durch diese polare Kopfgruppe sind alle Phosphoglyceride grenzflächenaktiv und bilden bevorzugt geordnete Aggregate. Man findet sie in hoher Konzentration in sämtlichen biologischen Membranen.



Strukturell und funktionell sehr ähnlich sind die Sphingolipide, die ein Sphingosinmolekül an Stelle des Glycerinrückgrats enthalten. Ebenso ist eine endständige Fettsäure ersetzt, da Sphingosin bereits eine lange Kohlenstoffkette enthält. Man findet auch hier Phosphocholin als mögliche Kopfgruppe (Sphingomyelin), aber auch Einfachzucker wie Galaktose (Cerebroside) oder komplexe Oligosaccharide (Ganglioside). Liegt die OH-Gruppe des Sphingosins allerdings ungebunden vor, spricht man von einem Ceramid. Sphingolipide kommen besonders häufig in der Myelinscheide von Nervenfasern vor, aber auch wie die Phosphoglyceride in Plasmamembranen.

Cholesterin gehört zur Gruppe der Steroide und setzt sich aus vier kondensierten Ringen zusammen, die an mehreren Stellen substituiert sind. Der Alkoholsubstituent kann entweder frei oder mit einer Fettsäure verestert vorliegen. 6-8 g Cholesterin werden pro Tag in unserem Körper synthetisiert und nur etwa 1 g wird mit der Nahrung aufgenommen. Es ist sowohl wichtiger Bestandteil der Plasmamembran als auch Vorstufe für Steroidhormone und Gallensäuren, wobei letztere maßgeblich an der Fettverdauung beteiligt sind. Aus einer Vorstufe der Cholesterinbiosynthese wird außerdem mit Hilfe von UV-Strahlung Vitamin D hergestellt^{4, 7-8}.

2.3 LIPOPROTEINE

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Lipide in Wasser werden Nahrungsfette, also Triacylglyceride, Phosphoglyceride, Sphingolipide und Cholesterine sowie deren Ester, mit Hilfe von speziellen Proteinen aggregiert und in Lösung gebracht. Diese mehr oder weniger globulären Aggregate nennt man Lipoproteine⁴.

2.3.1 KLASSIFIZIERUNG, STRUKTUR UND ZUSAMMENSETZUNG

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt historisch nach ihrer unterschiedlichen Dichte, über die sie in einer Ultrazentrifuge separiert werden können⁹. Die großen Chylomikronen weisen die geringste Dichte auf, gefolgt von VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) und HDL (high density lipoprotein). Letztere besitzen als kleinste Partikel die höchste Dichte und werden häufig in HDL2 und HDL3 unterschieden (Abb. 2.7).

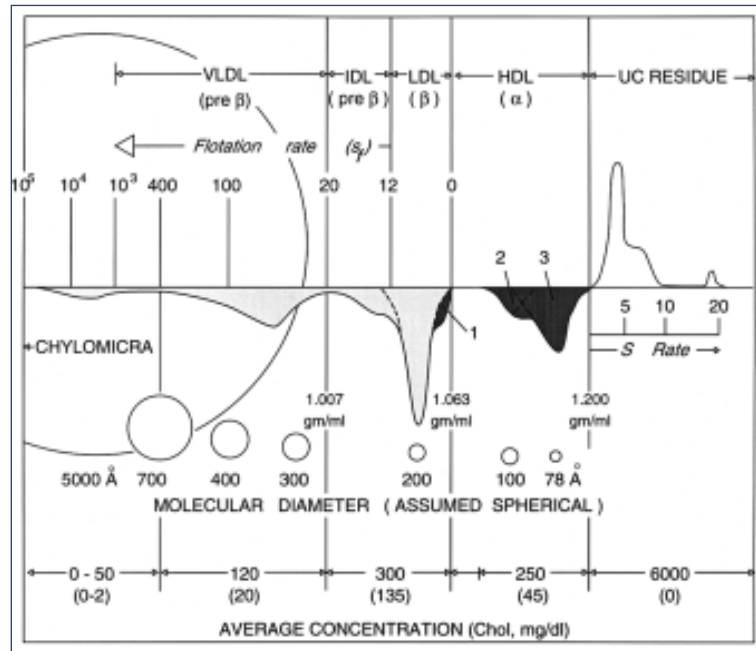


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der wichtigsten Lipoproteine in menschlichem Plasma¹⁰: dargestellt sind die Flotationsraten in der Ultrazentrifuge in Svedberg-Einheiten, ihre ungefähre Größe und Cholesterin-Konzentration in Plasma in mg/dL; UC residue = Lipoprotein Deficient Serum (LPDS)

Die strukturelle Anordnung der Lipoproteine beruht auf demselben Prinzip wie das biologischer Membranen. Die grenzflächenaktiven Lipide zeigen systematisch nach außen um den Partikel im wässrigen Milieu löslich zu machen. Im Inneren werden die gänzlich hydrophoben Lipide verpackt. Die Lipide werden von Apolipoproteinen in Form gehalten, die zudem mit anderen Proteinen wechselwirken können und somit die Verstoffwechselung der Lipoproteine steuern⁴.

Die Zusammensetzung und der detaillierte Aufbau der Lipoproteine sind abhängig davon in welcher Phase des Stoffwechsels sich der Partikel gerade befindet. Die Gruppe um Ala-Korpela hat auf diesem Gebiet bedeutende Erkenntnisse erzielt und diese mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen verglichen und kombiniert¹¹⁻¹². So war es ihnen möglich, Modelle für die einzelnen Lipoproteinklassen zu errechnen, die nach dem heutigen Stand der Forschung die wohl beste Beschreibung des Lipoproteinaufbaus darstellen (Abb. 2.8).

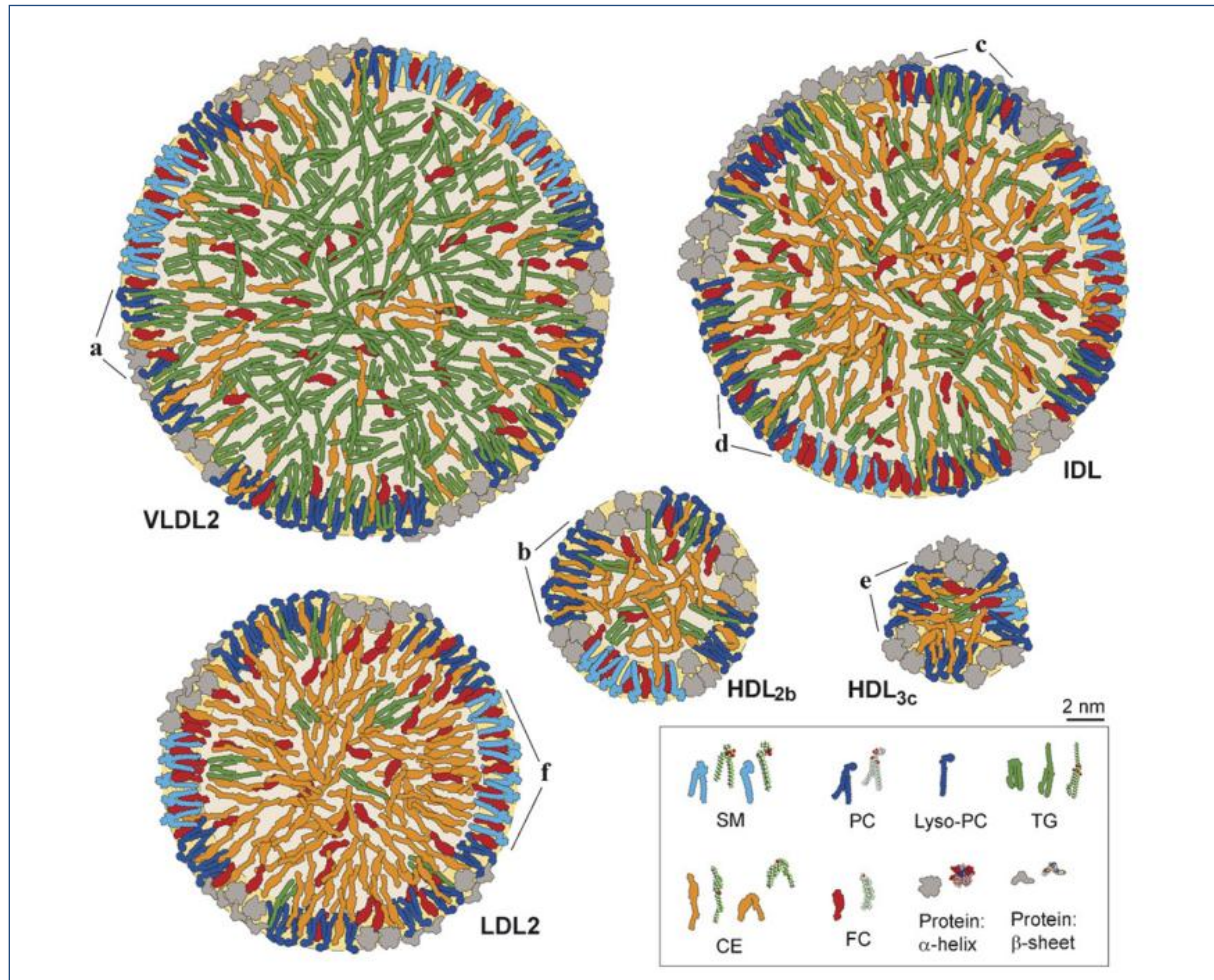
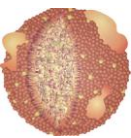


Abb. 2.8: Schematische Zusammensetzung und Struktur von VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3¹²

SM = Sphingomyelin (hellblau), PC = Phosphatidylcholin (dunkelblau), TG = Triacylglycerid (grün), CE = Cholesterinester (orange), FC = Freies Cholesterin (rot), Apolipoproteine (grau)

Nach diesem Modell findet man in der äußeren Membran zwei unterschiedliche Bereiche. Der eine ist besonders reich an Sphingomyelin und Cholesterin, die bevorzugt miteinander wechselwirken und eine dicht gepackte Abgrenzung zur äußeren Umgebung hervorrufen. Der andere ist besonders reich an Phosphoglyceriden. Die Packung ist hier weniger dicht, so dass hydrophobe Lipide wie Cholesterinester und Triacylglyceride, die sich vorwiegend im Inneren des Partikels befinden nach außen penetrieren. In diesen Bereichen findet der Lipidaustausch mit der Umgebung statt.

Für LDL wurden abhängig von der Temperatur der Umgebung unterschiedliche Anordnungen der hydrophoben Lipide im Kern beobachtet. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur von etwa

20-30 °C liegen die Lipide in einer smektischen Phase vor, oberhalb in einem ungeordneten Zustand (Abb. 2.9)¹³.

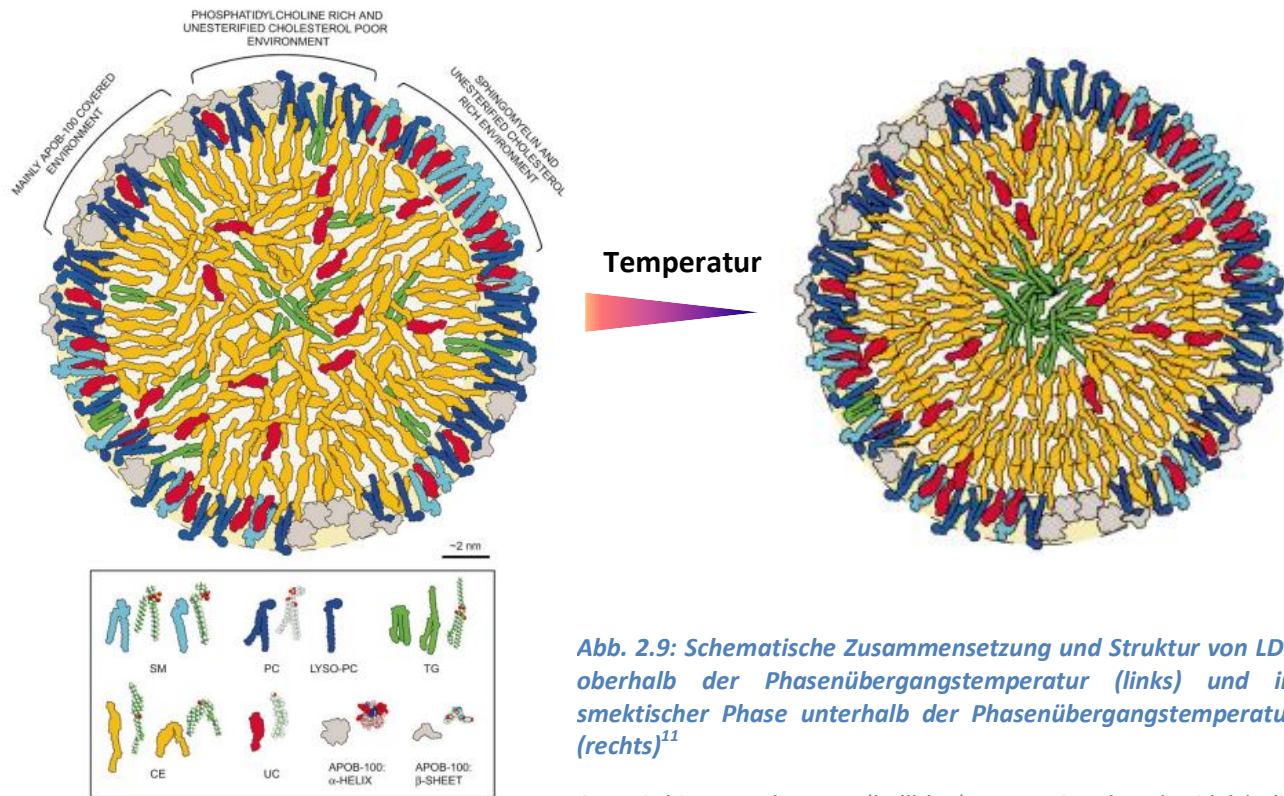


Abb. 2.9: Schematische Zusammensetzung und Struktur von LDL oberhalb der Phasenübergangstemperatur (links) und in smektischer Phase unterhalb der Phasenübergangstemperatur (rechts)¹¹

SM = Sphingomyelin (hellblau), PC = Phosphatidylcholin (dunkelblau), TG = Triacylglycerid (grün), CE = Cholesterinester (orange), UC = Unverestertes Cholesterin (rot), ApoB100 (grau)

Pregetter et al. erkannten eine Korrelation zwischen Phasenübergangstemperatur, welche sie mit dynamischer Differenzkalorimetrie bestimmt haben, und chemischer Zusammensetzung der Lipide, die von dem Verhältnis der Cholesterinester (CE) zu den Triacylglyceriden (TG) abhängig ist. Zudem postulierten sie unterhalb eines Verhältnisses von 7:1 eine andere strukturelle Anordnung wie darüber, wonach sich bei einem Verhältnis unterhalb der Unstetigkeit im inneren Kern nur Triacylglyceride befinden, in einer mittleren Schale eine Mischung aus TG und CE. Oberhalb dieses Verhältnisses liegen in der mittleren Schale nur CE vor und im inneren Kern eine Mischung aus TG und CE (Abb. 2.10).

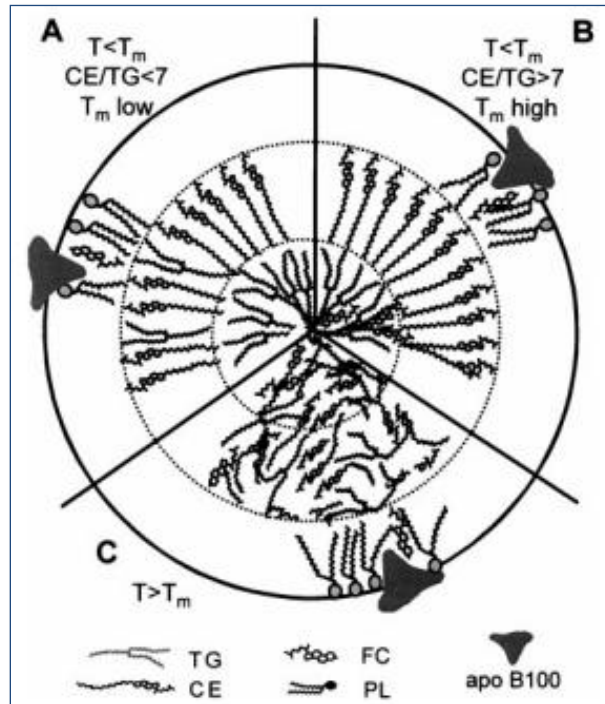
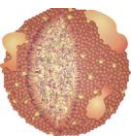


Abb. 2.10: Postulierte strukturelle Anordnung der Lipide in LDL abhängig von dem Verhältnis von Cholesterinester (CE) zu Triacylglycerid (TG) im Kern des Partikel: Unterhalb eines Verhältnisses von 7:1 ordnen sich die TG im inneren Kern an und eine Mischung aus TG und CE in einer mittleren Schale darum herum, oberhalb dieses Verhältnisses besteht die mittlere Schale einzig aus CE und der innere Kern aus einer Mischung aus TG und CE

2.3.2 METABOLISMUS

Der Stoffwechsel der Lipoproteine wird über Apolipoproteine reguliert. Dabei dienen sie entweder als Strukturelemente für den Lipidtransport, als Enzym-Cofaktoren oder als Liganden für Rezeptoren. ApoA1 und ApoAII sind strukturegebend für HDL, ApoB100 entsprechend für VLDL, IDL und LDL und ApoB48 für Chylomikronen. Während die ApoA-Proteine auch mehrfach pro Partikel vorkommen und zwischen Lipoproteinen austauschen können, ist ApoB100 fest mit genau einem Partikel verbunden. ApoB48 wird von demselben Gen kodiert wie ApoB100, die Aminosäure-Sequenz entspricht jedoch nur 48% der Sequenz in ApoB100¹⁴⁻¹⁶.

Der Metabolismus der Lipoproteine wird im Allgemeinen in drei Pfade gegliedert, einen exogenen, welcher den Lipidtransport über Chylomikronen nach der Nahrungsaufnahme vom Darm in die Leber beschreibt, einen endogenen über VLDL, IDL und LDL von der Leber in die peripheren Gewebe und

einen rückwärtigen Cholesterintransport über HDL von den Geweben zurück zur Leber (Abb. 2.11 und Tab. 2.1).

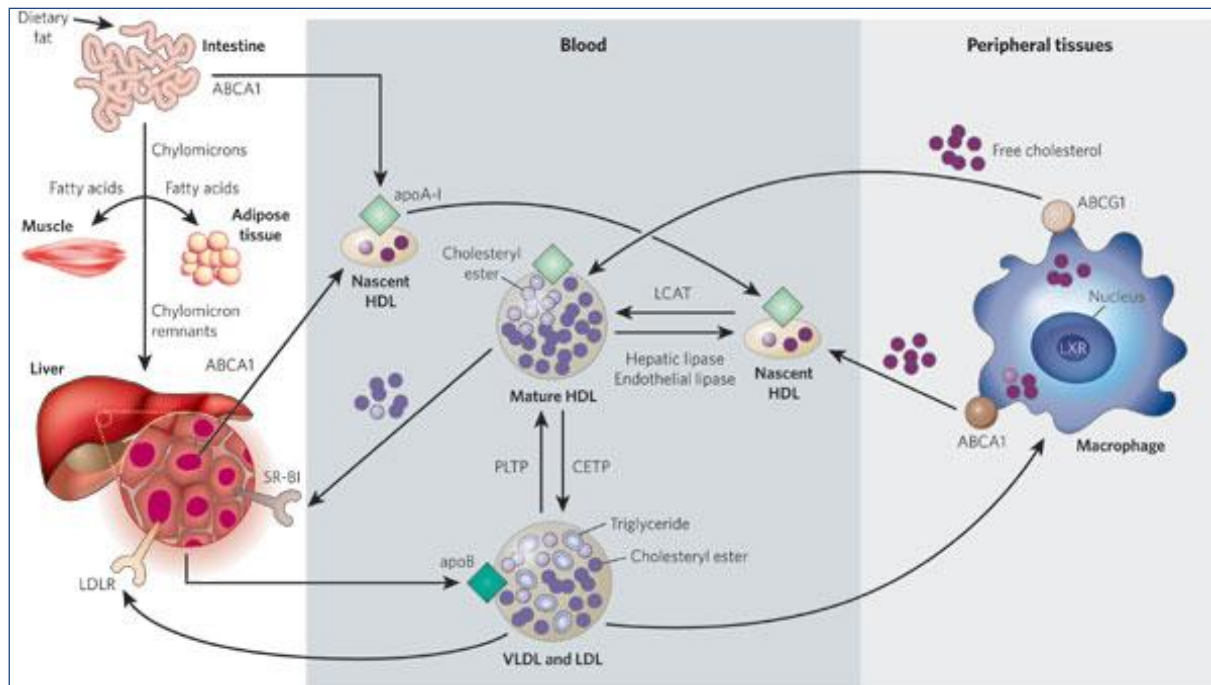
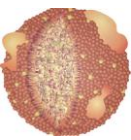


Abb. 2.11: Lipoprotein-Metabolismus¹⁷: Nahrungsfette werden im Dünndarm in Chylomikronen verpackt, welche durch ApoB48 zusammengehalten und durch das Blut zu peripheren Geweben transportiert werden; die darin enthaltenen Triacylglyceride (TG) werden durch das Enzym Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert und im Muskel verbraucht oder im Fettgewebe gespeichert; die daraus entstehenden Chylomikron Remnants werden von der Leber aufgenommen; in der Leber werden VLDL abgesondert, die reich an TG sind und durch ApoB100 in Form gehalten werden; VLDL wird ebenso durch LPL verarbeitet und über IDL zu LDL abgebaut, welches entweder wieder von der Leber über einen speziellen LDL-Rezeptor (LDLR) aufgenommen werden kann; HDL werden im Darm oder der Leber durch die Absonderung von ApoA1 erzeugt, welches die Aufnahme von Cholesterin aus diesen Organen über den ABCA1-Transporter steuert; die daraus entstehenden naszierende HDL nehmen Cholesterin aus Geweben und Makrophagen auf, wiederum über ABCA1; in reifen HDL wird dieser Transporter durch ABCG1 ersetzt; freies Cholesterin wird mit Hilfe der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) in Cholesterinester umgewandelt; Cholesterin wird entweder direkt über HDL zur Leber transportiert oder mittels Cholesterinester-Transferase (CETP) auf ApoB-enhaltende Partikel übertragen

Im Dünndarm werden die mit der Nahrung aufgenommenen Fette an ApoB48 angelagert und als Chylomikronen von Enterozyten über den Milchbrustgang ins Plasma abgesondert. Im Gegensatz dazu werden VLDL in der Leber an ApoB100 gebunden und von Hepatozyten in die Blutbahn abgegeben. Sowohl Chylomikronen als auch VLDL nehmen von HDL ApoC (I-III) und ApoE auf. Die ApoC-Proteine regulieren die Aktivität des Enzyms Lipoproteinlipase (LPL), das Triacylglyceride hydrolysiert, so dass freie Fettsäuren von den Zellen aufgenommen werden können¹⁸. Es resultieren Chylomikron Remnants, beziehungsweise IDL. Beide können über einen ApoB/ApoE-Rezeptor von der Leber



aufgenommen werden. Etwa 10-20% der IDL werden jedoch weiter verstoffwechselt und durch die weitere Abgabe von Triacylglyceriden und ApoE zu LDL umgewandelt, welche nun reich an Cholesterin sind. LDL hat in Plasma eine relativ lange Lebenszeit, so dass benötigtes Cholesterin schnell zugänglich von Zellen aufgenommen oder zurück zur Leber zurücktransportiert werden kann, die es zum Beispiel zur Bildung von Gallensalzen benötigt. Jedoch kann es durch Oxidation von LDL im Plasma auch zur Bindung an Makrophagen und Bildung von Schaumzellen kommen, welche zur Einlagerung in Gefäßwände und somit zur Entstehung von Gefäßkrankheiten führen können^{14, 17, 19}.

Apolipoprotein	Hauptfunktionen		Vorkommen
ApoAI	Strukturgebend für HDL	Ligand zur HDL-Bindung, LCAT-Kofaktor, Aufnahme von Cholesterin	CM, VLDL, HDL
ApoAII	Strukturgebend für HDL	Ligand zur HDL-Bindung, LCAT-Kofaktor, Modulation der LPL- und HTGL-Aktivität	CM, VLDL, HDL
ApoAIV	Ligand zur HDL-Bindung, LCAT-Aktivator		CM, VLDL, HDL
ApoB48	Strukturgebend für CM		CM
ApoB100	Strukturgebend für VLDL, IDL und LDL	Ligand für LDL-Rezeptor	VLDL, IDL, LDL
ApoCI	LCAT- und LPL-Aktivator		CM, VLDL, HDL
ApoCII	LCAT- und LPL-Aktivator		CM, VLDL, HDL
ApoCIII	LPL-Inhibitor, HTGL-Inhibitor, Modulator für Aufnahme von TG-reichen Lipoproteinen durch LRP		CM, VLDL, HDL
ApoD		Unbekannt, in einigen Tumoren angehäuft	HDL
ApoE		Ligand für B/E-Rezeptor, LRP und ApoE2-Rezeptor	CM, VLDL, IDL, HDL

Tab. 2.1: Übersicht über die Apolipoproteine und ihre Hauptfunktion im Lipoprotein-Stoffwechsel¹⁴: HDL = High density protein, LCAT = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, LPL = Lipoprotein-Lipase, HTGL = Hepatische Triglycerid-Lipase, VLDL = Very low density protein, IDL = Intermediate density protein, LDL = Low density protein, LRP = LDL-Rezeptor-verwandtes Protein

Naszierende diskoidale HDL werden zusammen mit ApoC und ApoE aus Leber oder Darm abgesondert. Durch Aufnahme von Cholesterin aus umgebenden Zellen nehmen die HDL-Partikel an Größe zu und werden zu reifen globulären HDL. Das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) wandelt dabei Cholesterin in Cholesterinester um. ApoAI und ApoAII, sowie die entstehenden Cholesterinester regulieren dessen Aktivität. HDL nimmt nun weiter Cholesterin aus peripheren Geweben auf, welches entweder wieder zur Leber zurück transportiert oder auf Chylomikronen oder VLDL übertragen wird. Dieser Mechanismus funktioniert mit Hilfe der Cholesterinester-Transferase

(CETP), welche Cholesterinester aus HDL im Austausch gegen Triacylglyceride aus den ApoB-enthaltenden Lipoproteinen überträgt^{14, 17, 19-20}.

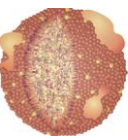
2.3.3 ANALYSE VON LIPOPROTEINEN

Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts noch Infektionskrankheiten als häufigste Todesursachen galten, wurden diese durch die Entdeckung und Verwendung von Impfstoffen und Antibiotika, sowie durch verbesserte Hygieneverhältnisse in den Industrieländern weitgehend eingedämmt. Die heute häufigsten Todesursachen sind Herzinfarkte oder andere Herz-Kreislaufkrankungen, die in enger Verbindung mit der Cholesterinkonzentration im Blut stehen. Heute geht man davon aus, dass hohe LDL-Cholesterin-Werte Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen, im Gegensatz dazu hohe HDL-Cholesterin-Werte einen positiven Effekt auf den Organismus ausüben²¹. Im Speziellen stellen einzelne Subklassen von Lipoproteinen, wie zum Beispiel sehr kleine dicht gepackte LDL, einen Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten dar²².

Da eine direkte Analyse der Lipoproteine und ihrer Zusammensetzung alles andere als trivial ist, wird in klinischen Laboren routinemäßig lediglich der Gesamt-Cholesteringehalt von LDL und HDL mit enzymatischen Methoden bestimmt⁶. Für detailliertere Untersuchungen ist ein höherer Aufwand erforderlich.

Durch die Isolierung der gesamten Lipide aus den Lipoproteinen erhält man wichtige Informationen über deren Zusammensetzung. Folch et al. fanden schon Ende der 50er Jahre heraus, dass man mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 Lipide quantitativ aus Gewebe extrahieren konnte²³. Diese Methode ist in vereinfachter Form auch auf Lipide im Blut anwendbar²⁴. Dazu ist es jedoch sinnvoll die Lipoproteine als Reifractionen vorab zu isolieren, was standardmäßig durch sequentielle Ultrazentrifugation bewerkstelligt wird⁹ oder in analytischen Mengen auch über Gelfiltrationsmethoden, wodurch sich sogar mit nur geringer Probenmenge in sehr kurzer Zeit vereinfachte Lipoprotein-Profile erstellen lassen²⁵. Eine massenspektroskopische Analyse kann nach erfolgter Separation Aufschluss über die Lipidverteilung geben²⁶⁻²⁷.

Eine universell einsetzbare Methode ist die NMR-Spektroskopie, mit der nicht nur eine quantitative Aussage über bekannte Substanzen gemacht werden kann, sondern auch eine Charakterisierung von



unbekannten Molekülen möglich ist. Über eine Fülle von Pulssequenzen können Strukturinformationen in physiologischer Umgebung erhalten werden, ohne die Probe zu verändern²⁸⁻³¹.

NMR-Spektren von Lipoproteinen zeigen eine auffällige Frequenzverschiebung der Methyl- und Methylen Gruppen, die charakteristisch mit der Größe der Lipoproteine korreliert. Zwei Forschungsgruppen nutzten diesen Effekt unabhängig voneinander zur Quantifizierung der Lipoprotein-Zusammensetzung mit Hilfe von Fitmodellen, die die Linienform der Methylgruppe von Serum durch die Linienformen der isolierten Lipoproteinklassen simulierten (Abb. 2.12 und Abb. 2.13)³²⁻³³.

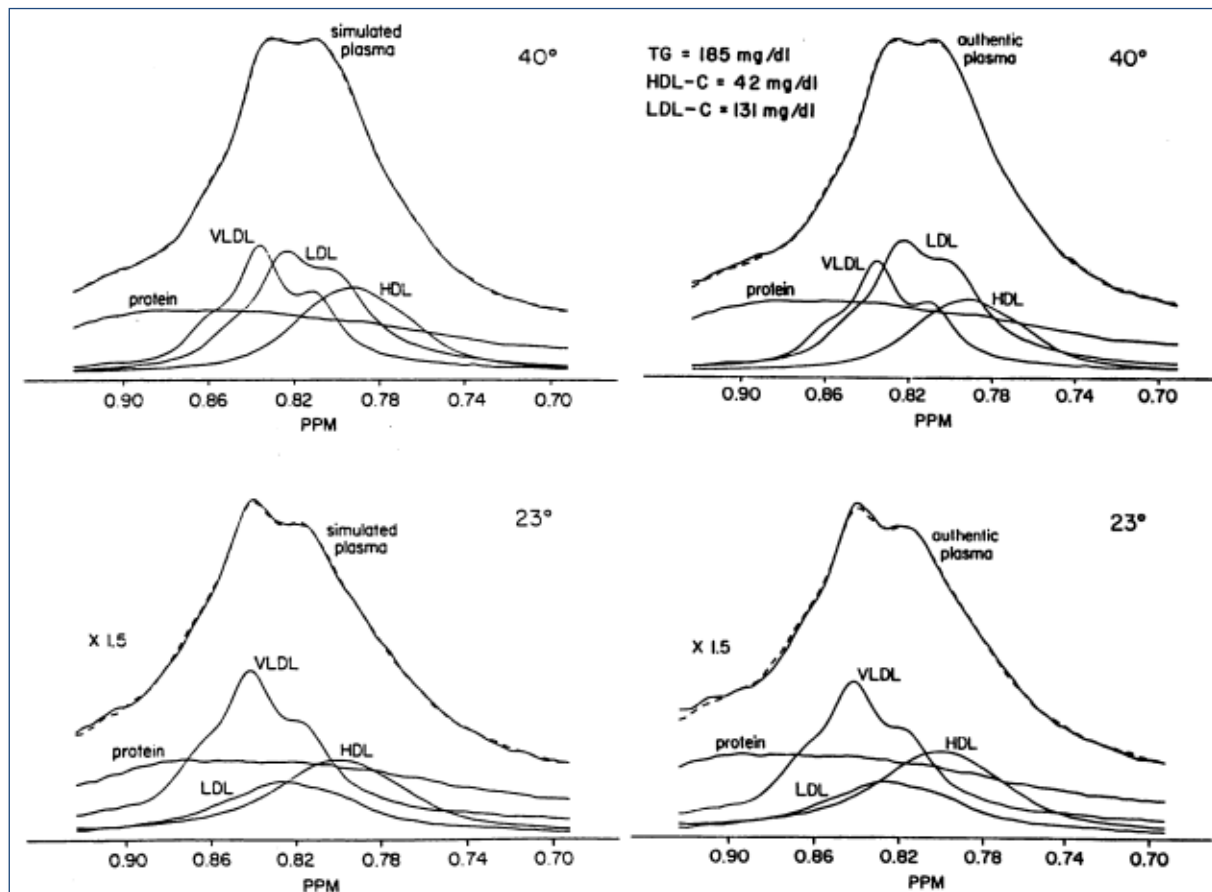


Abb. 2.12: Simulierte NMR-Spektren von Serum (links) anhand der Methylgruppen-Signale der Lipoproteinklassen im Vergleich zu den tatsächlichen NMR-Spektren (rechts) bei 23 °C und 40 °C³⁴

Beide Methoden lieferten gute Korrelationen mit biochemischen Analysen. Otvos et al. patentierten dieses Verfahren und nutzten es heute noch als kommerziellen Assay, der als NMR LipoProfile® von LipoScience bekannt ist.

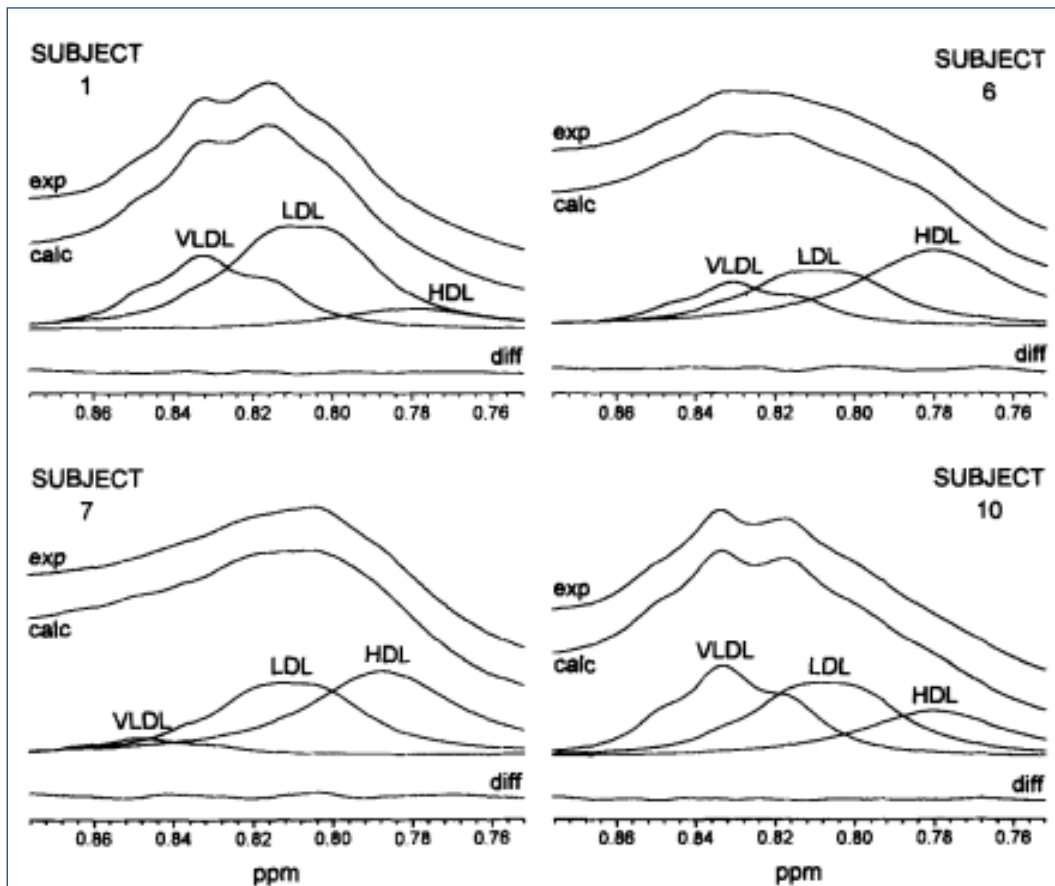


Abb. 2.13: Simulierte NMR-Spektren von Serum anhand der Methylgruppen-Signale der Lipoproteinklassen im Vergleich zu den tatsächlichen NMR-Spektren verschiedener Testpersonen³³

Lounila et al. haben eine physikalische Formel zur Berechnung dieser chemischen Verschiebung aufgestellt. Sie gingen davon aus, dass die Membran, die die Lipoproteine umgibt, in einer klar strukturierten Anordnung vorliegt, so dass die grenzflächenaktiven Lipide gerichtet nach außen zeigen. Die magnetische Suszeptibilität ist somit abhängig von der Ausrichtung der Lipide. Im Inneren des Partikels postulierten sie einen ungeordneten Zustand (Abb. 2.14). Anhand der Differenz der Suszeptibilitäten parallel und senkrecht zum äußeren Magnetfeld konnten sie eine Formel aufstellen, die die chemische Verschiebung in Abhängigkeit des Radius des Partikels beschreibt.

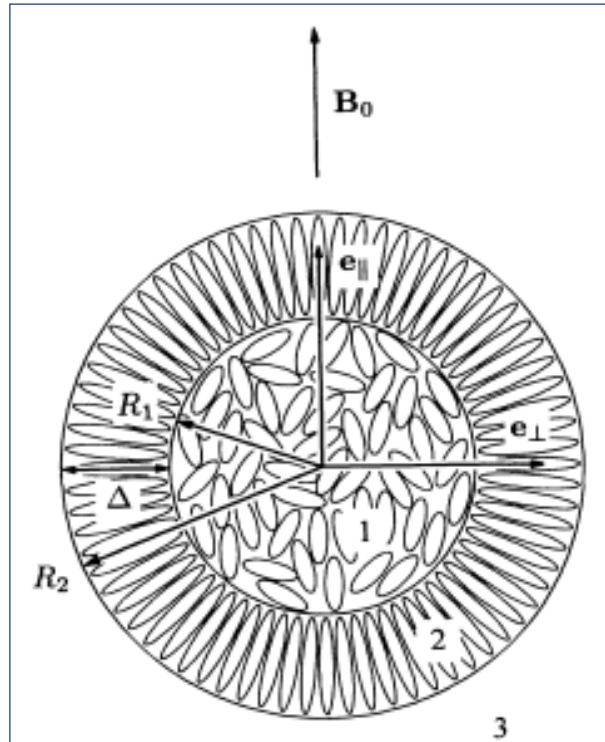
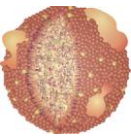


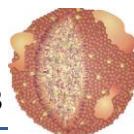
Abb. 2.14: Schematische Darstellung eines Lipoproteinmodells zur Berechnung einer Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Größe des Partikels³⁵: R_1 = Radius des ungeordneten hydrophoben Partikelinneren (Umgebung 1), R_2 = Radius des gesamten Partikels, Δ = Breite der umgebenden Membran (Umgebung 2), Umgebung 3 = Medium, das den Partikel umgibt, e = Einheitsvektoren parallel oder senkrecht zum äußeren Magnetfeld B_0

Wie gezeigt ist die Analyse von Lipoproteinen von medizinisch sehr hohem Interesse, jedoch noch lange nicht ausgereift. Auch die Struktur und die genaue Zusammensetzung der einzelnen Partikel sind noch nicht völlig erschlossen. Methodisch und analytisch besteht demnach noch großer Informationsbedarf.

3 MATERIAL UND METHODEN

Geräte und Zubehör

Avance 800 mit TCI-Cryoprobekopf oder QXI-Probekopf	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Avance 600 mit TXI-Cryoprobekopf	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Norell 502 NMR-Probentröhrchen, 5 mm	Euriso-Top, Saint-Aubin, France
Zirkoniumoxid-Keramiktöhrchen mit Autoklav, 5 mm, 250 MPa Maximaldruck	Daedalus Innovations LLC, Philadelphia, USA
L-70 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Festwinkelrotor Type 75 Ti (Behältervolumen 13.5 mL)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Polycarbonat Flasche 10 mL, dickwandig, mit Noryl- Verschlusskappe (für Type 75 Ti)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Festwinkelrotor Type 70 Ti (Behältervolumen 39 mL)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Schwenkbecherrotor SW 41 Ti (Behältervolumen 13.2 mL)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Schwenkbecherrotor SW 55 Ti (Behältervolumen 5 mL)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vakuumzentrifuge RC10.10. mit Kühlfalle RCT 60	Jouan GmbH, Unterhaching
Hettich Universal 320 R	Hettich AG, Bäch
Heraeus Biofuge Pico	DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK
ÄKTA-FPLC-System mit Frac-900-Fraktioniereinheit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
C 26/60 Säule gefüllt mit Superose 6 prep grade	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 200 prep grade	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 75 prep grade	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Transmissions-Elektronen-Mikroskop Philips CM12, LaB6 Kathode	FEI Electron Optics, Eindhoven, Niederlande
Slowscan CCD Kamera Typ 0124 (1024 x 1024 Pixel, à 24 µm)	TVIPS GmbH, Gauting
Harrick Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-XG	Harrick Scientific Co., New York, USA
Kupfernetzchen für Elektronenmikroskopie (G2400 Cu)	Plano GmbH, Wetzlar
Typhoon Variable Mode Imager	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
UV/VIS Spektrophotometer DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
32 pH Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Milli-Q Integral Wasseraufbereitungssystem	Millipore GmbH, Schwalbach
SONOREX SUPER RK 255 H Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
50 µL Exmire Microsyringe (Hamilton-Spritze)	Ito Corporation, Obuchi, Japan
Chemikalien (Analysequalität)	
HMW Native Marker Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
NativePAGE Sample Buffer (4x)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt



2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonsäure (DSS)	Euriso-Top, Saint-Aubin, France
Chloroform D1 mit TMS (0,03 Vol%) 99.8 Atom%D, stab. mit Ag	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure D4 99.5 Atom%D	Euriso-Top, Saint-Aubin, France
Methanol D4 99.8 Atom%D	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol – EtOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumbromid – KBr	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid – KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat – KH_2PO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat – $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
N-(3-Sulfopropyl)-4-(4-(Didecylamino)Styryl)Pyridinium	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Natriumazid – NaN_3	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumbromid – NaBr	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat – Na_2CO_3	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid – NaCl	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat – NaHCO_3	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid – NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfat – Na_2SO_4	Merck KGaA, Darmstadt
OptiPrep Density Gradient Medium	Progen, Heidelberg
Salzsäure 1 mol/L – HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Titriplex III – EDTA	Merck KGaA, Darmstadt

Verbrauchsmaterial

Polyallomer Röhrchen 13.2 mL, dünnwandig (für SW 41 Ti)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Polyallomer Röhrchen 5 mL, dünnwandig (für SW 55 Ti)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Polyallomer Quick-Seal Röhrchen 39 mL, dünnwandig (für Type 70 Ti)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 well	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rotilabo-Probenfläschchen 2 mL mit Schraubkappe und teflonbeschichtetem Silikon-Septum	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotilabo-Eimalküvetten Einmal-Küvetten, Halbmikro, 1,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotilabo-Zentrifugenröhrchen 15 mL, ohne Stehrand	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
VIVASPIN 6 10000 MWCO	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, France
Stericup & Steritop (Sterilfilter)	Millipore GmbH, Schwalbach

Software

NMR	TOPSPIN 2.1	Auremol 2.4.0	
Elektronenmikroskopie	EM-MENU 4.0	ImageJ v1.45s	
Gelelektrophorese	Image Quant 5.2		
Berechnungen	MATLAB R2009a	Origin 6.0	Microsoft Excel 2007
Grafiken	CorelDRAW Graphics Suite X4	ISIS Draw 2.3	

3.1 PUFFER

3.1.1 PBS-PUFFER

Chemikalien	c [mM]
NaCl	137.0
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10.1
KH ₂ PO ₄	1.8
NaN ₃ (0.02%)	3.1
EDTA x 2 H ₂ O	0.3
pH	7.4

Tab. 3.1: Zusammensetzung von PBS-Puffer, der pH-Wert wurde mit 1M NaOH oder 1M HCl eingestellt, anschließend wurde steril filtriert

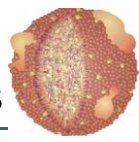
3.1.2 EXTRAZELLULÄRER PUFFER

Chemikalien	c [mM]
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	2.2
Na ₂ SO ₄	0.4
NaCl	94.6
KCl	5.0
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.85
Na ₂ CO ₃	17.0
NaHCO ₃	8.0
HAc-d (1M)	21.1
NaN ₃ (0.02%)	3.1
pH	7.4

Tab. 3.2: Zusammensetzung von extrazellulärem Puffer^{29, 36}, der pH-Wert wurde mit 1M NaOH oder 1M HCl eingestellt, anschließend wurde steril filtriert

3.2 PROBENPRÄPARATION

Das benötigte Serum für alle Untersuchungen wurde entweder vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin an der Uniklinik Regensburg erhalten oder von gesunden nüchternen Spendern in Arztpraxen entnommen. Anschließend wurde das Serum eingefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.



3.2.1 FRAKTIONIERUNG VON SERUM DURCH SEQUENTIELLE ULTRAZENTRIFUGATION

Durch Ultrazentrifugation bei einer spezifischen Dichte können die Lipoproteinklassen des Serums voneinander getrennt werden. Dazu wird die Dichte der einzelnen Serumproben durch Zugabe einer definierten Menge an KBr festgelegt. Die Abhängigkeit folgt der Formel 3.1³⁷⁻³⁸.

Masse von KBr [g] =

Endvolumen [mL] * (neue Dichte - alte Dichte)

1 - 0.321 * neue Dichte

3.1

Man definiert die Dichte dabei so, dass sie der Maximaldichte der zu erhaltenden Lipoproteine entspricht. Eine detaillierte Auflistung ist in Tab. 3.3 dargestellt.

Lipoproteinklasse	Dichtebereich [g/mL]	Eingestellte Dichte [g/mL]
VLDL	0.940 – 1.006	1.006
IDL	1.006 – 1.019	1.019
LDL	1.019 – 1.063	1.063
HDL2	1.063 – 1.125	1.125
HDL3	1.125 – 1.210	1.063

Tab. 3.3: Dichtebereiche der einzelnen Lipoproteinklassen und die erforderliche Dichte zur Isolation mittels sequentieller Ultrazentrifugation

Je etwa 8 - 10 mL der Probe wurden in spezielle Polycarbonatbehälter gefüllt und in einem vorgekühlten Festwinkelrotor Type 75 Ti unter Vakuum für 24 h bei 4 °C und 60000 rpm ultrazentrifugiert. War nicht genügend Probenmaterial vorhanden, konnte mit PBS-Puffer derselben Dichte verdünnt werden. Die Lipoproteine mit höherer Dichte sedimentieren zum Boden des Gefäßes, die mit niedrigerer Dichte schwimmen oben auf. Entsprechend wurde nach beendeter Zentrifugation das obere Drittel der Probe entnommen. Dabei war darauf zu achten die Probe nicht zu verwirbeln. Der Rückstand wurde auf die nächste gewünschte Dichte eingestellt und erneut unter denselben Bedingungen ultrazentrifugiert. Die erhaltenen Proben wurden in Konzentratoren mit der Ausschlussgröße 10000 Da aufkonzentriert und in extrazellulären Puffer überführt.

Alternativ wurden Proben aus dem Universitätsklinikum Regensburg (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin) erhalten, die mit einem Festwinkelrotor Type 70 Ti getrennt wurden. Die Trennprozedur war ansonsten dieselbe.

Bovines Serum wurde aus dem Forschungsinstitut für Biologie Landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf (Forschungsbereich Ernährungsphysiologie) erhalten und nach identischen Bedingungen am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin separiert.

3.2.2 FRAKTIONIERUNG VON SERUM DURCH DICTEGRADIENTEN-ULTRAZENTRIFUGATION

Sämtliche Lipoproteine wurden nach einer leicht abgewandelten Methode von Chapman et al.³⁹ in einem einzigen Schritt direkt aus Serum isoliert. Die Präparation wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

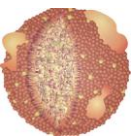
Serum wurde auf eine Dichte von 1.21 g/mL eingestellt. Anschließend wurde für die 6 Schwenkbecher des Rotors jeweils ein Dichtegradient aus NaCl und KBr erzeugt, der aus folgenden Stufen aufgebaut wurde:

Chemikalien	Dichte [g/mL]	Volumen [mL]
NaCl-Lösung	1.006	2.5
NaCl/KBr-Lösung	1.019	2.5
NaCl/KBr-Lösung	1.063	2.0
Serum	1.210	3.0
NaCl/KBr-Lösung	1.240	2.0

Tab. 3.4: Komponenten des Dichtegradienten

Alle Lösungen enthielten 0.01% EDTA und 0.01% NaN_3 bei einem pH-Wert von 7.4. Die Trennung erfolgte in einem Ausschwingrotor SW 41 Ti für 48 h bei 15 °C und 40000 rpm. Der Rotor wurde nicht gebremst. Nach beendeter Zentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen mit einer Pipette von oben abgetragen.

Alle Subfraktionen wurden nach erfolgter Trennung in extrazellulären Puffer überführt.



3.2.3 SUBFRAKTIONIERUNG VON HDL DURCH DICTEGRADIENTEN-ULTRAZENTRIFUGATION

Zuvor separiertes HDL wurde mit Hilfe der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in unterschiedliche Subklassen zerlegt. Die Präparationen wurden am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

Zur Subfraktionierung von HDL wurde ein Optiprep-Dichtegradient verwendet. Optiprep-Lösungen sind Iodixanol-Verbindungen, die den Vorteil haben, dass sie bis zu einer Dichte von 1.32 g/mL isoosmotisch sind (Abb. 3.1)⁴⁰⁻⁴⁴.

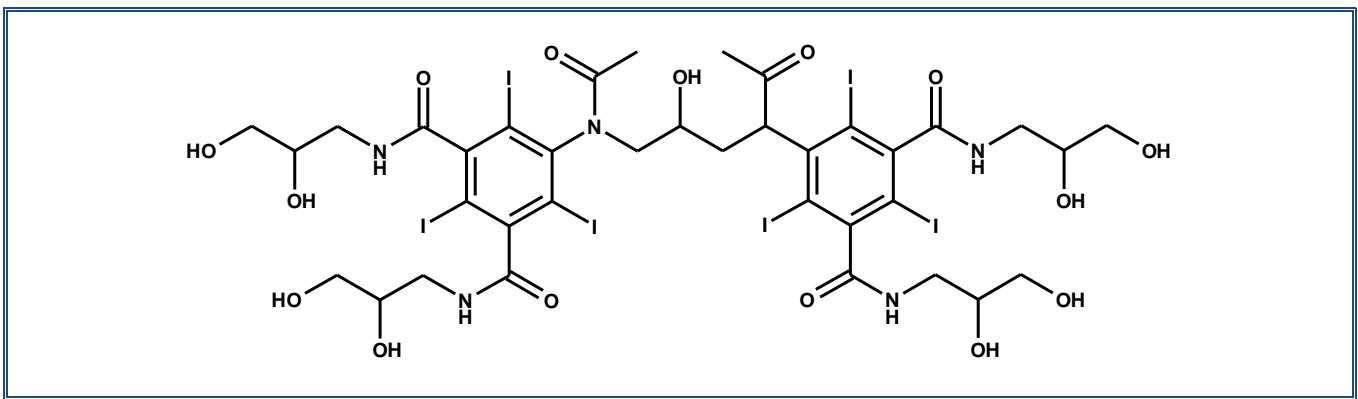


Abb. 3.1: Molekülstruktur von Iodixanol (Optiprep)

Die HDL-Probe wurde auf eine Dichte von 1.213 g/mL eingestellt (40% Optiprep). Dann wurde ein linearer Gradient von 1.213 g/mL (40% Optiprep) bis 1.079 g/mL (15% Optiprep) angelegt und in einem Ausschwingrotor SW 41 Ti für 48 h bei 15 °C und 40000 rpm ultrazentrifugiert. Der Rotor wurde nicht gebremst. Nach beendeter Zentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen mit einer Pipette von oben abgenommen.

Alle Subfraktionen wurden nach erfolgter Trennung in extrazellulären Puffer überführt.

3.2.4 SUBFRAKTIONIERUNG DER LIPOPROTEINE DURCH GELFILTRATION

Ein alternativer Weg der Subfraktionierung von Lipoproteinklassen ist die Gelfiltration, wobei hier nicht nach Dichte getrennt wird, sondern nach Größe. Minimale Größenunterschiede führen zu verzögerter Elution aus der Säulenmatrix, wobei größere Partikel zuerst eluiert werden, da sie weniger effizient in die Poren der Matrix diffundieren können. Es wurden zwei verschiedene

Gelfiltrationsmaterialien mit unterschiedlichen Porengrößen verwendet. HDL wurde über Superdex 200 fraktioniert, größere Partikel über Superose 6. Es wurde grundsätzlich steril filtrierte und entgastes Laufmittel hergenommen und im Kühlschrank bei 4 °C gearbeitet. Nach Äquilibration der Säule mit PBS-Puffer wurden 1-2 mL der zu trennenden Probe möglichst konzentriert auf die Säule aufgetragen. Sobald ein Anstieg in der Absorption bei 280 nm zu sehen war, wurde das Eluat in Fraktionsröhrchen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit Konzentratoren der Ausschlussgröße 10000 Da aufkonzentriert und in extrazellulären Puffer überführt.

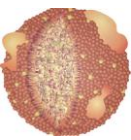
3.2.5 EXTRAKTION

Zur quantitativen Extraktion von Gesamtserum oder aufgereinigten Lipoproteinfraktionen wurde eine etwas abgewandelte Methode von Srivastava et al.^{24, 45} verwendet. Dazu wurden 500 µL Probenmaterial in einem 1.5 mL Eppendorf Cup in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend an einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Der farblose oder leicht gelbliche Feststoff wurde anschließend in ein 2 mL Probenfläschchen aus Glas überführt und in 700 µL einer 2:1-Mischung aus Chloroform D1 (+ 0,03 Vol% TMS) und Methanol D4 resuspendiert. Organische Lösungen wurden dabei mit Hilfe einer Hamilton-Spritze überführt, um Verunreinigungen durch gelöste Kunststoffe zu vermeiden. Das Glasgefäß wurde mit einem passenden Deckel mit Teflonbeschichtung verschlossen und zweimal für 10 min im Ultraschallbad bestrahlt. Zur besseren Handhabung wurde das Glasgefäß in ein Zentrifugenröhrchen gestellt und 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der unlösliche Proteinanteil setzte sich ab und der Überstand wurde direkt in ein NMR-Röhrchen pipettiert.

3.3 NMR-SPEKTROSKOPIE

3.3.1 ALLGEMEINES

Alle Proben wurden zu je 500 µL in NMR-Röhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm überführt und an einem Avance 600 mit TXI-Cryoprobekopf oder einem Avance 800 mit TCI-Cryoprobekopf gemessen. Die einzelnen Parameter und präparativen Unterschiede wässriger und organischer Proben sind in Tabelle Tab. 3.5 zusammengestellt.



	Wässrige Proben	Organische Proben
Zusammensetzung	475 µL Probe + 25 µL 2 mM DSS in D ₂ O	2:1-Mischung aus Chloroform D1 (+ 0,03 Vol% TMS) und Methanol D4
Spektrometer	Avance 600 oder Avance 800	Avance 600
Temperatur	310 K	293 K
Standard-Pulsprogramm	noesygppr1d	zg
Wartezeit (d1)	≥ 2 s	≥ 5 s
Mischzeit (d8)	10 ms	-
Akquisitionszeit (AQ)	2.04 s (800 MHz) 3.41 s (600 MHz)	1.52 s (extrahierte Proben) oder 4.00 s (Lipidstandards)
NS	variabel, je nach Verdünnung	256 (extrahierte Proben) oder 16 (Lipidstandards)
Anregungspuls (p1)	90°	90°
Repetitionszeit	AQ + d1 + d8	AQ + d1
Digitale Auflösung	0.24 Hz (800 MHz) 0.15 Hz (600 MHz)	0.33 Hz (extrahierte Proben) oder 0.13 Hz (Lipidstandards)
lb (line broadening)	2.0	0.3
FID Baseline Korrektur	qfil mit Filterbreite 0.5 (bcfw)	-

Tab. 3.5: Unterschiede in der Verarbeitung wässriger und organischer NMR-Proben

Vor jeder Messung wurde der 90°-Puls bestimmt, die Transmitterfrequenz für die Wasserunterdrückung optimiert und der Receiver Gain variabel angepasst. Anschließend wurden die wässrigen Proben mit einer FID Baseline Korrektur versehen um das restliche Wassersignal zu reduzieren. Dies lieferte insbesondere bei sehr verdünnten Proben und Diffusionsmessungen sehr viel einheitlichere Ergebnisse. Phasen- und Baseline-Korrektur wurden individuell für jedes Spektrum durchgeführt. Alle Spektren wurden auf DSS oder TMS referenziert, mit Ausnahme der Serum- und Proteinproben, bei denen DSS auf Grund von Wechselwirkungen in der verwendeten Konzentration nicht klar erkennbar war. Hier wurde die Referenzfrequenz anhand von direkt zuvor oder danach gemessenen Proben angeglichen. Für Hochdruckmessungen von Serum wurde Alanin bei 1.46 ppm als Referenz verwendet.

3.3.2 T₁-MESSUNGEN DURCH INVERSION RECOVERY

Um sicherzustellen, dass alle Spins vollständig wieder zurück in z-Richtung relaxiert sind, wurden T₁-Zeiten bestimmt. Dazu wurden Inversion Recovery-Experimente mit der Pulssequenz ‚t1ir‘

durchgeführt. Die resultierenden Signalintensitäten wurden anschließend gegen die entsprechenden variablen Wartezeiten aufgetragen und nach der Formel 3.2 gefittet⁴⁶. Der Fehler des Fits wurde als sogenanntes Konfidenzintervall angegeben (Siehe Kapitel 3.5.1).

$$I(t) = I_0 * (1 - (1 - \cos(\alpha) * e^{\frac{-t}{T_1}}))$$

3.2

I = Relative Intensität des Spektrums, I_0 = Intensität des ersten Spektrums, α = Auslenkwinkel des ersten Pulses, t = Wartezeit, T_1 = Longitudinale Relaxationszeit

3.3.3 T_2 -MESSUNGEN DURCH SPIN-ECHO

Die Linienbreiten der NMR-Signale sind stark abhängig von den T_2 -Zeiten der Moleküle. Deshalb wurden Spin-Echo-Experimente mit der Pulssequenz ‚cpmgpr‘ durchgeführt. Die resultierenden Signalintensitäten wurden anschließend gegen die entsprechenden variablen Echozeiten aufgetragen und nach der Formel 3.3 gefittet⁴⁶.

$$I(t) = I_0 * e^{\frac{-t}{T_2}}$$

3.3

I = Relative Intensität des Spektrums, I_0 = Intensität des ersten Spektrums, t = Wartezeit, T_2 = Transversale Relaxationszeit

3.3.4 BERECHNUNG VON DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN UND DARAUS RESULTIERENDER MOLARER MASSEN UND RADIIEN

Diffusionsgewichtete NMR-Spektren wurden grundsätzlich mit Hilfe von Pseudo-2D-Messungen mit der Pulssequenz ‚ledbpgppr2s‘ angefertigt (Abb. 3.2). Dabei wurde mit dem Befehl ‚dosy‘ in TOPSPIN eine lineare Liste der gewünschten Gradientenstärken erstellt, meist von 5% bis 90% oder von 10% bis 90% in jeweils 5%-Schritten. Die Diffusionsspektren wurden demnach nacheinander erzeugt und in ein 2D-Spektrum transferiert, das entweder direkt in TOPSPIN ausgewertet oder durch den Befehl ‚rsr‘ wieder in die einzelnen Teilspektren zerlegt werden konnte.

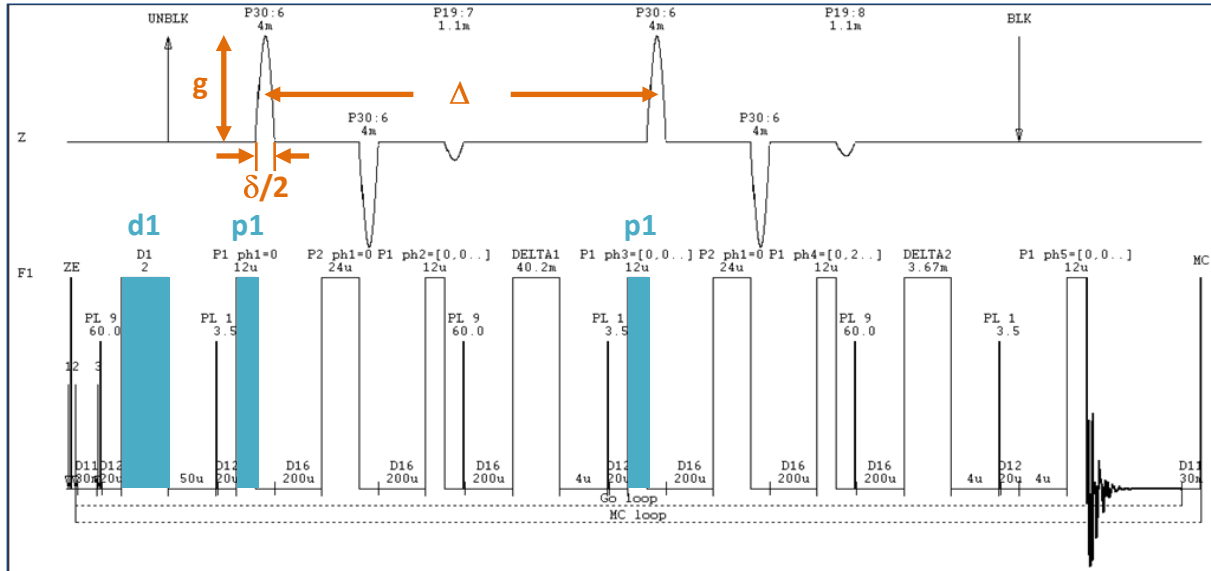
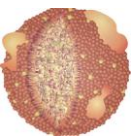


Abb. 3.2: Pulssequenz ‚ledbgppr2s‘ aus TOPSPIN 2.1: $d1$ = Wartezeit, $p1$ = Anregungspuls, δ = Gradientenlänge, Δ = Diffusionszeit, g = Gradientenstärke (siehe Tab. 3.5)

Um die Diffusionskoeffizienten zu bestimmen, wurden die Intensitäten der erhaltenen NMR-Signale gegen die Gradientenstärke aufgetragen und nach der Formel 3.4 gefittet, wobei der Fit in MATLAB, Origin oder Excel durchgeführt werden konnte, was im Bezug auf das Ergebnis keine nennenswerten Unterschiede lieferte. Es wurden die Intensitäten der gewünschten Peakmaxima verwendet, außer es wird explizit darauf hingewiesen, dass die Integrale berechnet wurden. Der Fehler des Fits wurde als sogenanntes Konfidenzintervall angegeben (Siehe Kapitel 3.5.1). Der erhaltene Diffusionskoeffizient ist nicht absolut sondern relativ, da die Konstanten γ , δ , Δ und g zwar direkt in die Formel mit einberechnet wurden, aber diese über eine gewisse Zeit Schwankungen unterliegen können. Die maximale Gradientenstärke, die in g mit eingeht, wurde experimentell bestimmt und für die Dauer aller Messreihen als konstant angenommen. Innerhalb einer Messreihe waren die Diffusionskoeffizienten somit relativ zueinander konsistent und man konnte mit einem geringen Fehler die Größe der Diffusionskoeffizienten effektiv berechnen.

$$I(g) = I_0 * e^{-D \gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) g^2} = I_0 * e^{-D c g^2} \quad 3.4$$

*I = Relative Intensität beziehungsweise Integral des Spektrums, I_0 = Intensität beziehungsweise Integral des ersten Spektrums, D = Diffusionskoeffizient, $\gamma = 42576400 * 2\pi$ (Gyromagnetisches Verhältnis), $\delta = 2-4$ ms (Gradientenlänge), $\Delta = 50-100$ ms (Diffusionszeit), g = Gradientenstärke; letztere setzt sich zusammen aus maximaler Gradientenstärke (0.546 T/m für das verwendete 600 MHz-Spektrometer, 0.541 T/m für das verwendete 800 MHz-Spektrometer) multipliziert mit dem Gradienten-Formfaktor (0.9563 für den verwendeten Gradienten diff.100) und relativer Gradientenstärke in %*

Da Diffusionskoeffizienten mit der Masse korrelieren, kann man ausgehend von den Diffusionskoeffizienten der Partikel und derer von DSS, das sich ebenfalls in der Lösung befindet, über die Formel 3.5 auf die molaren Massen rückschließen⁴⁷. Hierbei spielen äußere Schwankungen keine Rolle, da sie durch die Differenzbildung der Diffusionskoeffizienten entfallen.

$$M_{\text{Probe}} = M_{\text{DSS}} * \left(\frac{D_{\text{DSS}}}{D_{\text{Probe}}} \right)^3 \quad 3.5$$

$M_{\text{DSS}} = 196,34$ g/mol

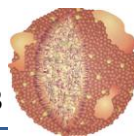
Ebenso ist eine Abschätzung des hydrodynamischen Radius möglich. Dazu wird D_2O als externer Standard im Anschluss oder vor der Messung der eigentlichen Probe unter denselben Bedingungen gemessen⁴⁷. D_2O selbst resultiert dabei in keinem Signal, wohl aber HDO aus dem restlichen in der Lösung vorhandenen Wasserstoff.

$$R_{h,\text{Probe}} = R_{h,\text{HDO}} * \left(\frac{D_{\text{HDO}}}{D_{\text{Probe}}} \right)$$

$$R_{h,\text{HDO}} = \frac{k_B T}{6\pi \eta D_{\text{HDO}}} \quad 3.6$$

*$k_B = 1.38 * 10^{-23}$ J/K, η = Viskosität von $D_2O = 0.8397$ mPa*s⁴⁸, $D_{\text{HDO}} = 3.027 * 10^{-9}$ m²/s⁴⁹*

Der absolute hydrodynamische Radius von D_2O ($R_{h,\text{HDO}}$) ergibt sich nach der Formel 3.6 (rechts) und wird aus Literaturwerten bei 310 K zu 0.0893 nm berechnet. Damit konnte nun ähnlich wie bei der molaren Masse auf die hydrodynamischen Radien der gewünschten Partikel geschlossen werden (Formel 3.6, links). Äußere Schwankungen spielen hier ebenfalls durch die Differenzbildung keine Rolle.



Um die Diffusionskoeffizienten wirklich exakt zu bestimmen, könnte man nach der Formel 3.6 (links) unter Verwendung des Literaturwertes für D_{HDO} bei 310 K auf die absoluten Diffusionskoeffizienten rückschließen. Da in dieser Arbeit allerdings nur die Diffusionskoeffizienten relativ zueinander interessierten, wurden stets die relativen Diffusionskoeffizienten angegeben.

Die Fehlerrechnung wurden nach dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz durchgeführt. Der Fehler der Diffusionskoeffizienten bezieht sich dabei auf das Vertrauensintervall der Fitberechnung (siehe Kapitel 3.5.2).

3.3.5 HANDHABUNG EXTRAHIERTER PROBEN

Da die extrahierten Proben in einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform D1 und Methanol D4 im Verhältnis 2:1 gelöst wurden, musste entsprechendes Augenmerk auf die Messroutine gelegt werden. Bewährt hat sich folgendes Vorgehen. Vor der Messung der eigentlichen Probe wurde ein NMR-Röhrchen mit 475 μL H_2O und 25 μL D_2O befüllt und die üblichen Standardeinstellungen vorgenommen. Dabei wurde das Locksignal auf $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$ eingestellt. Es wurde sowohl ein 1D-Shim als auch ein 3D-Shim durchgeführt, bis das Magnetfeld optimal reguliert war. Erst dann wurde das zu messende Probenröhrchen eingebracht, der Probenkopf abgestimmt und MeOD als Locksignal verwendet. Es wurde nur in z-Richtung geshimmt, anschließend CDCl_3 als Locksignal eingestellt und gemessen. Der 1D-Shim für CDCl_3 , sowie 3D-Shims für CDCl_3 oder MeOD als Locksignal lieferten nur ungenügende Ergebnisse.

Grundsätzlich war bei den Locksignalen darauf zu achten, dass Phase und Feldverschiebung separat korrigiert wurden, da gerade bei dem Lösungsmittelgemisch nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die automatische Einstellung in TOPSPIN zufriedenstellend war.

3.3.6 HOCHDRUCK-MESSUNGEN

Zur Durchführung von Hochdruck-NMR-Messungen wurde ein Zirkoniumoxid-Keramikeröhrchen verwendet, das einem Maximaldruck von 250 MPa standhält. Durch die Verwendung eines Volumenverdrängers aus PEEK waren 300 μL der Probe für eine Messung ausreichend. Das Röhrchen wurde über einen massiven Autoklav mit einer nichtmagnetischen Hochdruckleitung verbunden,

welche mit Methylcyclohexan gefüllt war. Eine PET-Membran diente als Separator zwischen dem Druckfluid und der wässrigen Lösung. Nach der Yamada-Methode konnte nun hydrostatischer Druck von einer Spindelpresse auf die Probe im Spektrometer übertragen werden⁵⁰. Gemessen wurde mit einem handelsüblichen QXI-Probenkopf an einem Avance 800 von Bruker.

3.4 ANALYSETECHNIKEN

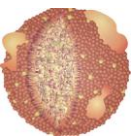
3.4.1 TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten am Zentrum für Elektronenmikroskopie der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg.

Unmittelbar vor dem Probenauftrag wurden mit einem Kohlefilm beschichtete Kupfernetzchen für ungefähr 20 s mit einem Plasma Cleaner/Sterilizer hydrophilisiert. 3-5 µL der wässrigen Proben wurden nun auf die befilmten Netzchen aufgetragen, die Probenflüssigkeit für etwa 3 s mit einem Filterpapier geblottet, das Netzchen für 1-2 s in H₂O gewaschen und wiederum die Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Zur Negativkontrastierung wurden 3 µl Uranylacetat (2% w/v in H₂O; pH 4.5) aufgetragen. Nach etwa 20 s wurde die Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt und abschließend die Probe an der Luft getrocknet.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem CM12 Transmissions-Elektronenmikroskop bei 120 keV Beschleunigungsspannung durchgeführt. Die Bilddokumentation erfolgte bei einer 5.000 bis 35.000 fachen Primärvergrößerung mit einer Slowscan CCD Kamera, wobei die Software EM-MENU 4.0 verwendet wurde.

Zur Auswertung der Aufnahmen wurde das frei verfügbare Programm ImageJ verwendet, das zur Verarbeitung mikroskopischer Bilder geeignet und im Wesentlichen in Java geschrieben ist. Für dieses Programm stehen zahlreiche Makros zur Verfügung, wodurch eine Manipulation der Lookup-Table, eine Filterung im Fourierraum (z.B. Bandpass-Filterung), das Setzen von Schwellwerten (Threshold) und auch eine detaillierte Partikelanalyse (Analyze particle) möglich waren.



3.4.2 GELELEKTROPHORESE

Gelelektrophoretische Untersuchungen wurden am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

Um Lipoproteine auf einem Gel sichtbar zu machen, muss ein geeignetes Färbereagens verwendet werden, das spezifisch mit Lipiden interagiert, wasserlöslich ist, aber nicht an Proteine, insbesondere Albumin, bindet. Entsprechend wurde ein spezieller zwitterionischer Fluoreszenz-Farbstoff verwendet (Abb. 3.3), der eben diese Eigenschaften aufweist. Die Fluoreszenz in reinem Wasser war minimal. Aus 100 µg dieses Farbstoffes in 1 mL Ethylenglykol wurde eine 1,67 µM Stammlösung hergestellt, von der 2 µL in einem 0.2 mL Eppendorf Cup vorgelegt und mit 5 µL der eigentlichen Probe vermischt. Nach 10 min wurden 10 µL einer Lösung aus 1 mL Optiprep (60%) und 200 µL NativePAGE Sample Buffer (4x) zugegeben. Als Standard wurde ein HMW Native Marker verwendet, dessen Zusammensetzung in Tab. 3.6 zusammengefasst ist.

Protein	Molare Masse [kDa]	Größe [nm]
Thyroglobulin	669	17.0
Ferritin	440	12.2
Catalase	232	10.0
Lactatdehydrogenase	140	8.2
Albumin	66	7.1

Tab. 3.6: Zusammensetzung des Proteinstandards (HMW Native Marker Kit)

Die Trennung erfolgte mit einem 4-12% Bis-Tris Gel bei 12 °C, zuerst für etwa 2 h unter angelegten 50 V, dann über Nacht bei 70 V. Als Puffer wurde eine Mischung aus 3 g/L Tris und 14.4 g/L Glycin in Wasser verwendet.

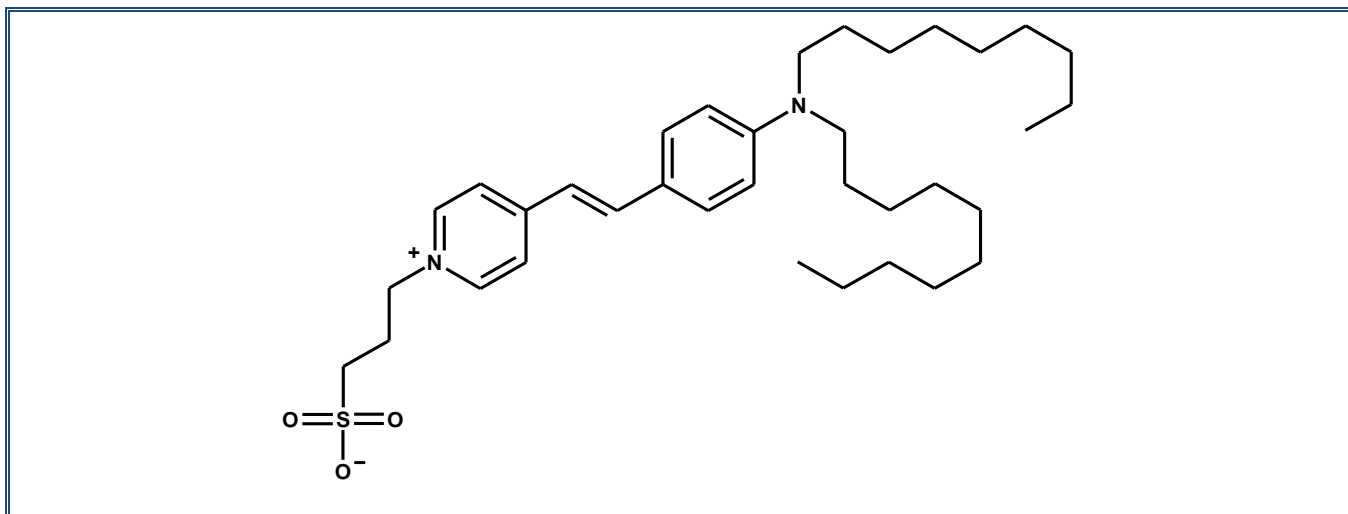


Abb. 3.3: Molekülstruktur des zwitterionischen Farbstoffs zum Anfärben von Lipiden: *N*-(3-Sulfopropyl)-4-(4-(Didecylamino)Styryl)Pyridinium

Die fertigen Gele wurden an einem Typhoon Variable Mode Imager eingescannt. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 488 nm, die Emission erfolgte bei 520 nm.

3.5 AUSWERTUNG

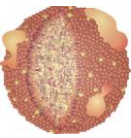
3.5.1 BERECHNUNGEN MIT MATLAB

Zum Einlesen der NMR-Spektren in MATLAB wurden zuerst die Daten aus TOPSPIN als Textdatei gespeichert. Dazu wurde der Befehl ‚convbin2asc‘ verwendet. Um die erzeugten Datenmengen und die Rechendauer variabel steuern zu können, wurde beim Einlesen in MATLAB meist eine Interpolation durchgeführt, bei der die Anzahl der Punkte im Vorhinein manuell festgelegt wurde.

3.5.2 FEHLERRECHNUNG BEI FITFUNKTIONEN

Zum Fitten von Datenreihen wurde die Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Non linear least squares) als Ausgleichsrechnung angewandt. Dabei konnte direkt der Vertrauensbereich (confidence bounds) berechnet werden, in dem sich 95% der gefitteten Punkte befinden müssen. Dieser Vertrauensbereich wurde bei den entsprechenden Berechnungen als Fehler angegeben.

Die verwendeten Quellcodes befinden sich im Detail in Kapitel 7.3 ab Seite 184.



4 ERGEBNISSE...

4.1 QUANTITATIVE ANALYSE DER LIPOPROTEINE IN SERUM

Serum besteht zum größten Teil aus Wasser, in dem hauptsächlich hochmolekulare Substanzen wie Proteine und Lipoproteine, aber auch niedermolekulare Substanzen wie Elektrolyte, Zucker oder Aminosäuren gelöst sind. NMR-spektroskopisch lassen sich die kleinen Moleküle als schmale Linien detektieren, die Proteine erscheinen als breites Untergrundsignal. Einige häufig vorkommende Molekülgruppen zeigen außerdem typische Signale, die man trotz der Überlagerung der diversen Proteine noch detektieren kann.

Abb. 4.1 zeigt ein NMR-Spektrum von Serum, aus dem durch Überführen in einen extrazellulären Puffer (siehe Kapitel 3.1.2) die niedermolekularen Substanzen entfernt wurden. Zudem ist ein typisches Spektrum der im Serum enthaltenen Proteine abgebildet.

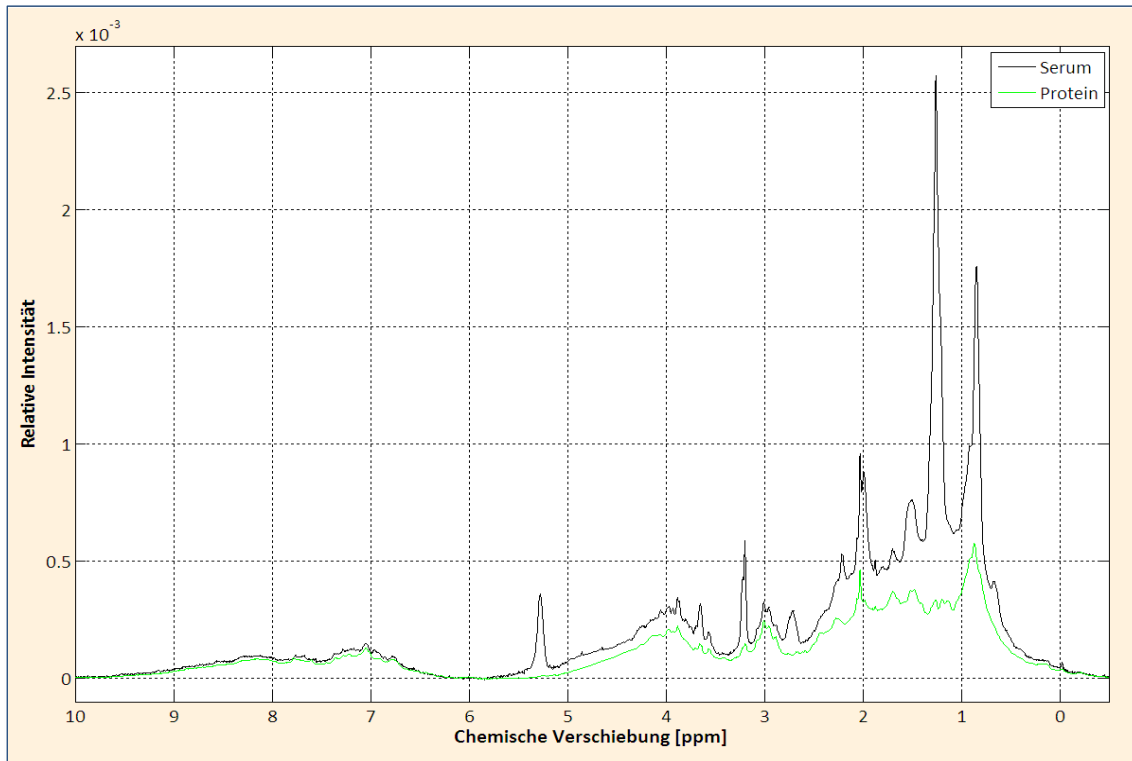


Abb. 4.1: NMR-Spektrum von Serum und aus Serum isolierten Proteinen: die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); das Spektrum von Serum wurde zu 5000 äquidistanten chemischen Verschiebungen in MATLAB eingelesen und interpoliert; zur Intensitätseichung wurde die Summe aller Signalthöhen auf 1.0 normiert; das Spektrum der Proteine wurde identisch behandelt und gemäß der Berechnung aus Kapitel 4.1.1 in der Intensität reduziert

Besonders die verschiedenen Lipide in den Lipoproteinen tragen zu den signifikanten Signalen bei. Im Spektrum der Proteine findet man diese Signale nicht. In Abb. 4.2 befindet sich hierzu eine schematische Zuordnung der Signale in einem NMR-Spektrum von Serum⁵¹⁻⁵³. In Abb. 4.3 wurde zudem der Proteinanteil derselben Probe subtrahiert, um eine bessere Übersicht über die Signale der verbleibenden Lipoproteine zu erhalten. Die Spektren stammen aus der Separation, die im folgenden Kapitel im Detail beschrieben wird.

Ziel dieser Teilarbeit war es, aus einem herkömmlich erzeugten NMR-Spektrum von gesamtem Serum eine Aussage über die Zusammensetzung und Konzentration der darin enthaltenden Komponenten zu treffen.

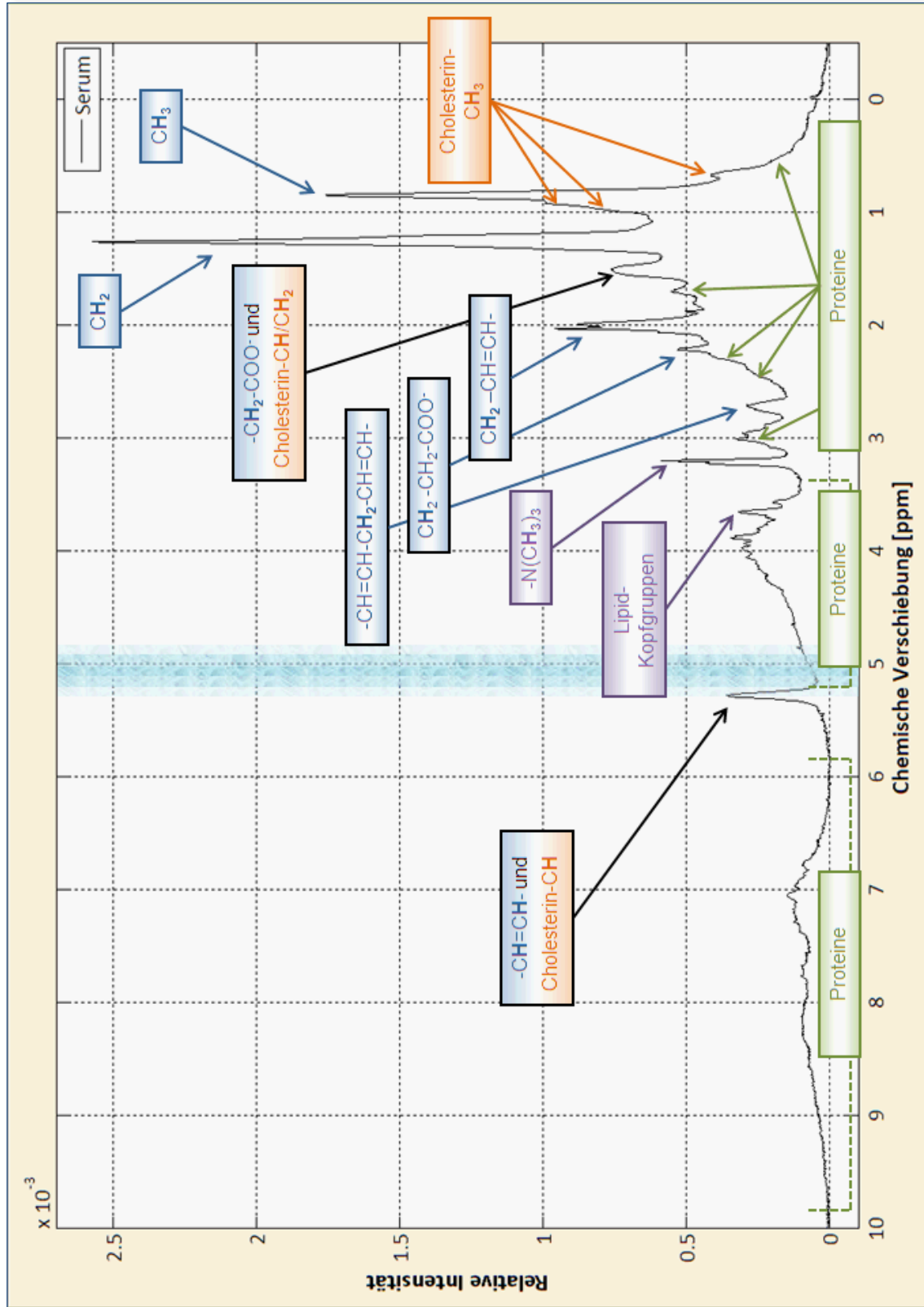
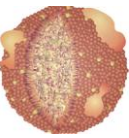


Abb. 4.2: Dominierende Signale in einem NMR-Spektrum von Serum (die Signale der Fettsäurereste wurden in blau gekennzeichnet, die des Cholesterins in orange, die Signale der Lipidkopfgruppen in violett und die Proteinsignale in grün, im Bereich um 5.0 ppm ist das Wassersignal unterdrückt): für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.1

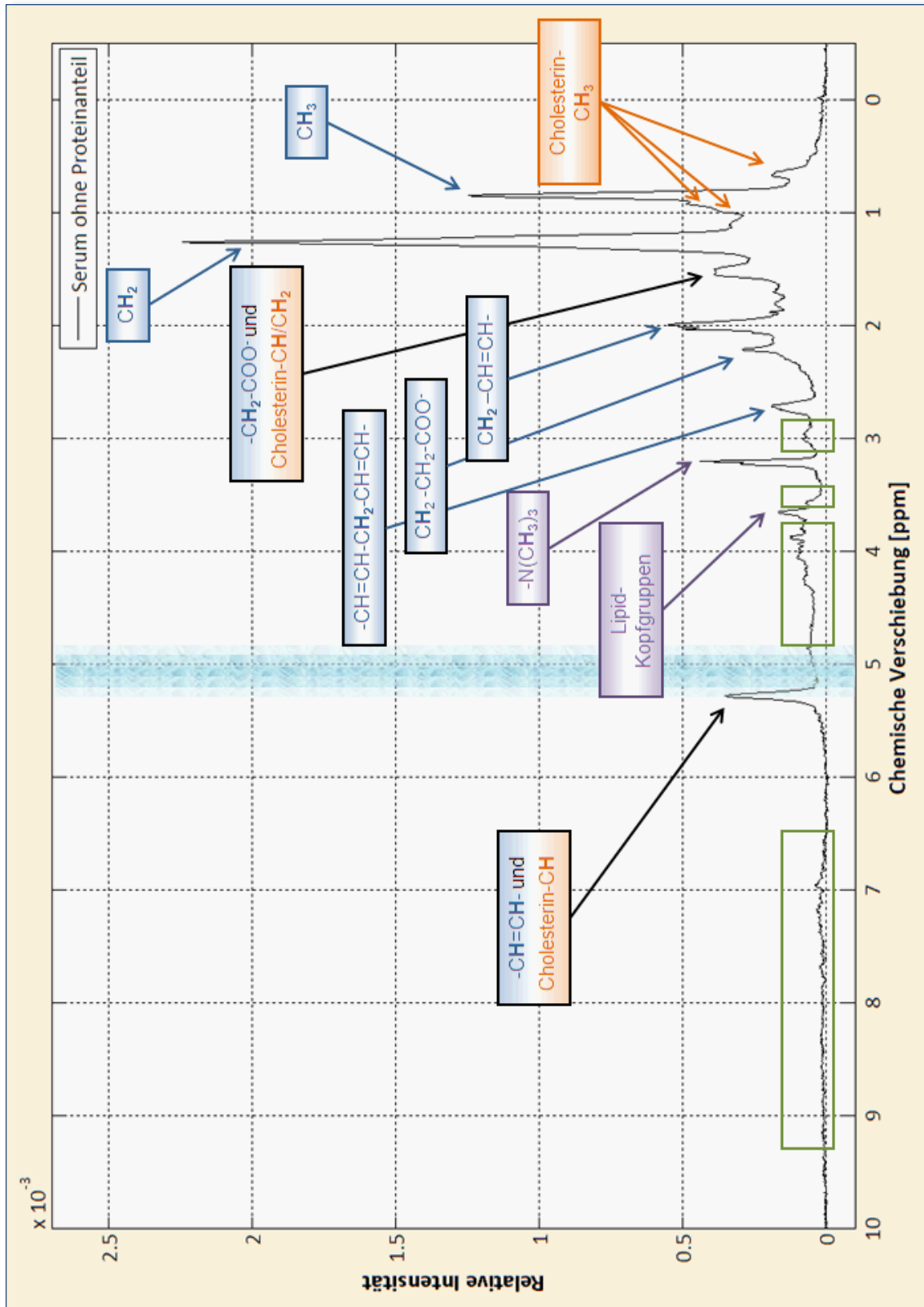
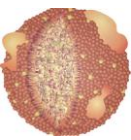


Abb. 4.3: Dominierende Signale in einem NMR-Spektrum von Serum ohne Proteinuntergrundsignal durch Differenz der Spektren aus Abb. 4.1 (die Signale der Fettsäurereste wurden in blau gekennzeichnet, die des Cholesterins in orange und die Signale der Lipidkopfgruppen in violett, im Bereich um 5.0 ppm ist das Wassersignal unterdrückt, restliche Proteinsignale, die nach Abzug des Spektrums noch identifiziert wurden, sind mit grünen Rechtecken versehen): für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.1



4.1.1 FRAKTIONIERUNG VON SERUM UND ANSCHLIEßENDE RÜCKFORMIERUNG DER ORIGINALPROBE

Serum von einem gesunden Spender wurde mittels sequenzieller Ultrazentrifugation in die Bestandteile VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3, sowie 2 verschiedene Proteinfractionen (LPDS) getrennt. Letztere wurden im letzten Trennschritt nach Entnahme des HDL3 schichtweise mit einer Pipette von oben abgenommen. Sowohl das ursprüngliche Serum als auch die Einzelfractionen wurden anschließend in extrazellulären Puffer mit dem pH 7.4 überführt und NMR-spektroskopisch bei 310 K, also Körpertemperatur, vermessen (Abb. 4.4). Die Proben wurden außerdem aliquotiert und für die Experimente in den Kapiteln 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.2.1 und 4.3 verwendet.

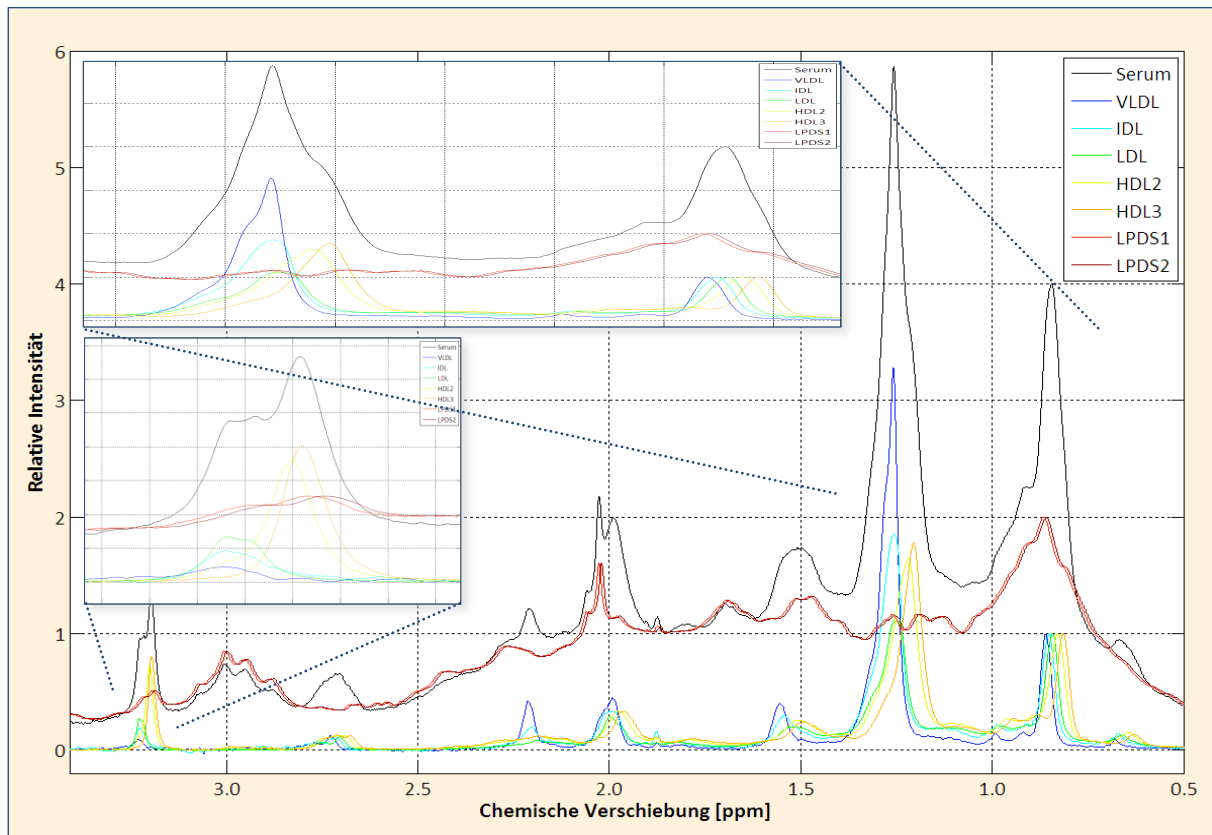


Abb. 4.4: NMR-Spektren von Serum, Lipoproteinfractionen (VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3) und Proteinfractionen (LPDS1 und LPDS2): die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH₃-Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Lipoproteinspektren auf 1.0 normiert, die der Proteine auf 2.0 und des Serumspektrums auf 4.0

Die chemischen Verschiebungen der Signalmaxima der CH₃- und CH₂-Gruppen, sowie der Cholin-Kopfgruppen sind in Tab. 4.1 zusammengestellt. Interessanterweise zeigen die CH₃-Gruppen eine

kontinuierliche Verschiebung bezüglich der x-Achse, die CH_2 - und Cholin-Kopfgruppen hingegen weisen eine Stufe zwischen ApoB-enhaltenden Partikeln (VLDL, IDL und LDL) und ApoA-enhaltenden Partikeln (HDL2, HDL3) auf, was auf eine unterschiedliche Struktur der Partikel schließen lässt. Die Struktur der Lipoproteine soll allerdings erst in Kapitel 4.2 diskutiert werden.

Lipoprotein-Klassen	Chemische Verschiebung [ppm] (CH_3)	Chemische Verschiebung [ppm] (CH_2)	Chemische Verschiebung [ppm] (Cholin)	Graphische Ansicht
VLDL	0.8607	1.2579	3.2289	
IDL	0.8508	1.2565	3.2280	
LDL	0.8419	1.2507	3.2274	
HDL2	0.8290	1.2189	3.2003	
HDL3	0.8142	1.2050	3.1960	

Tab. 4.1: Maxima einiger aussagekräftiger NMR-Signale der fraktionierten Lipoproteinklassen aus Serum aus Abb. 4.4; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH_3 -Gruppen aufgetragen; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH_3 -Gruppen aufgetragen

Die Spektren aller Proben wurden in MATLAB eingelesen und das Integral im Bereich von 3.14 ppm (Minimum) bis -0.5 ppm auf 1.0 normiert, so dass alle Spektren gleich gewichtet waren. Der Bereich um 5.0 ppm wurde mit Absicht ausgespart, um Fehler durch variierende Restintensitäten des Wassers möglichst gering zu halten. Das Serumspektrum wurde als Original mit 100% betrachtet und die Intensitäten der Einzelkomponenten entsprechend so variiert, dass als Summe wieder das Originalspektrum resultierte (Abb. 4.5). Da die einzelnen Komponenten signifikant bezüglich der x-Achse verschoben sind, kann man davon ausgehen, dass es keine alternative Lösung des Problems gibt. Kleine Fehler in der manuellen Phasen- und Baseline-Korrektur der Spektren wirken sich stark auf die Berechnung aus, wurden aber insofern minimiert, da sämtliche Spektren mit identischen Werten für die Phasenkorrektur versehen wurden.

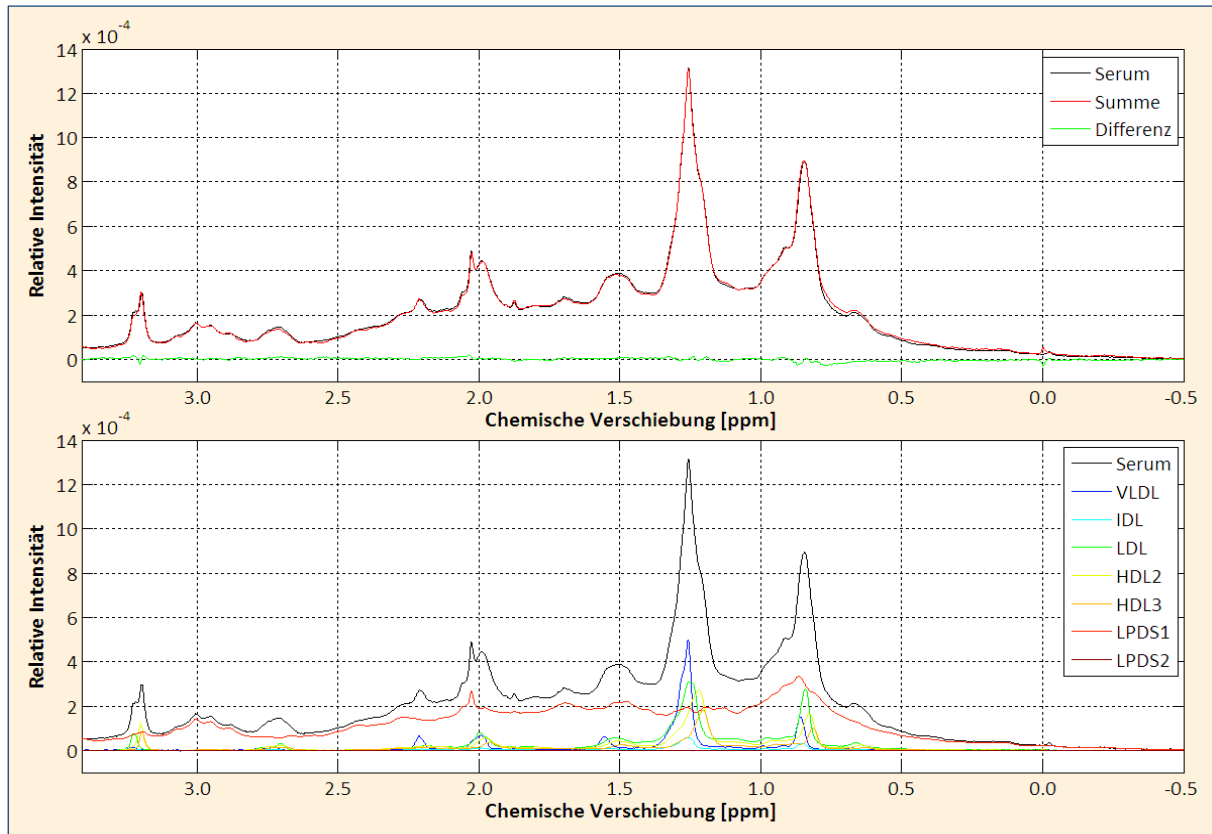
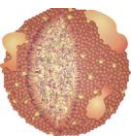


Abb. 4.5: Zusammensetzung des Serumspektrums aus den Lipoprotein- und Proteinspektren, die mittels sequentieller Ultrazentrifugation aus Serum isoliert wurden: jedes Spektrum wurde im Bereich von 3.14 bis -0.5 ppm zu 5000 äquidistanten chemischen Verschiebungen in MATLAB eingelesen und interpoliert; zur Intensitätseichung wurde die Summe aller Signalthöhen auf 1.0 normiert; **oben:** Summe der gewichteten Einzelspektren (rot) im Vergleich zum Originalspektrum (schwarz); **unten:** Originalspektrum von Serum und gewichtete Spektren der fraktionierten Komponenten; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.4

Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tab. 4.2 zusammengestellt. Das Quadrat der Einzelabweichungen betrug hierbei 0.0876%. Wie erwartet machen die reinen Proteinfractionen den größten Anteil aus. Zusammen beträgt dieser fast 2/3 des gesamten Serums. HDL2 und LDL sind in etwa gleich stark mit ca. 10% vertreten, gefolgt von VLDL mit gut 7% und HDL3 mit 5%. IDL ist nur in sehr geringen Mengen von 2% zu finden, was durchaus realistisch erscheint, da die Probe an sich sehr verdünnt war und nur durch eine erhöhte Messdauer ein adäquates Signal-zu-Rausch-Verhältnis lieferte.

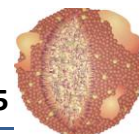
Lipoproteinklassen	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3	LPDS1	LPDS2
Prozentuale Verteilung der Lipoproteinklassen	7.18%	1.53%	11.96%	9.55%	5.64%	57.58%	6.73%
	20.03%	4.28%	33.35%	26.62%	15.73%	-	-
Fehler der Optimierung	0.0876%						

Tab. 4.2: Ergebnisse der Komponentenberechnung aus Abb. 4.5: Prozentuale Verteilung der Lipoprotein- und Proteinfractionen (oben), sowie der Vergleich der Lipoproteinemengen untereinander ohne Mitwirkung der Proteine (unten); die Prozentangaben beziehen sich hierbei auf die Integralverhältnisse der Spektren, dürfen aber nicht auf die entsprechende Anzahl der Partikel übertragen werden

Anhand dieser Daten allein kann man allerdings keine vollständige Aussage darüber treffen, wie hoch die relative Anzahl an Lipoproteinpartikeln tatsächlich ist, da die Signalintensität abhängig von der Zusammensetzung und der Partikelgröße der Lipoproteine ist. Deshalb wird im Folgenden die Lipidzusammensetzung der Lipoproteine diskutiert.

4.1.2 EXTRAKTION

Die im obigen Abschnitt verwendeten Proben wurden in deuteriertem Chloroform und Methanol extrahiert, um die verpackten Lipide quantitativ aus den Aggregaten zu lösen. Dazu wurde eine etwas abgewandelte Methode von Srivastava et al.^{24, 45} etabliert. 2006 wurde diese neue Extraktionsmethode vorgestellt, mit der Lipide aus Muskelgewebe in nur einem Schritt extrahiert werden konnten, und zudem noch in deutlich höheren Ausbeuten verglichen mit den Standardverfahren von Folch et al.²³ oder Bligh & Dyer⁵⁴. 2009 wurden auch Lipide aus Serum von Patienten mit Muskeldystrophie extrahiert²⁴. Dazu wurde Serum lyophilisiert und mit Methanol und Chloroform im Verhältnis 3:1 versetzt, im Ultraschallbad bestrahlt und mittels Filter vom ausgefallenen Protein getrennt. Anschließend musste das Filtrat gewaschen werden und das Eluat getrocknet, bevor es in deuteriertem Lösungsmittel wieder gelöst werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben ebenfalls gefriergetrocknet, allerdings wurde der Feststoff direkt in deuteriertem Lösungsmittel im Verhältnis 2:1 aufgenommen, wodurch der Zwischenschritt einer erneuten Trocknung entfällt und nicht nur zu einer Zeitersparnis führt, sondern somit auch die Gefahr unerwünschter Oxidationsreaktionen der Lipid-Doppelbindungen verringert. Ausgefallene Proteine wurden nicht filtriert, sondern in einer Zentrifuge pelletiert. Der Überstand konnte nun direkt in ein NMR-Röhrchen überführt werden (siehe Kapitel 3.2.5).



4.1.2.1 METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER LIPIDE IN DEN EXTRAHIERTEN PROBEN

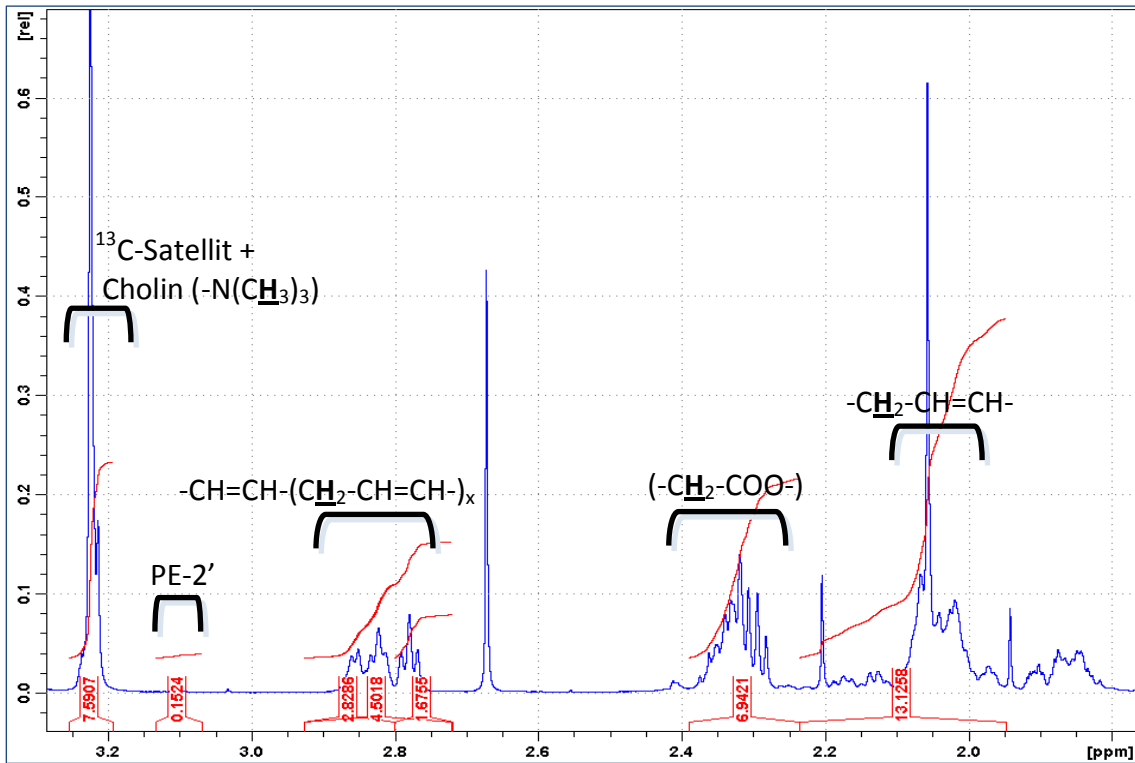
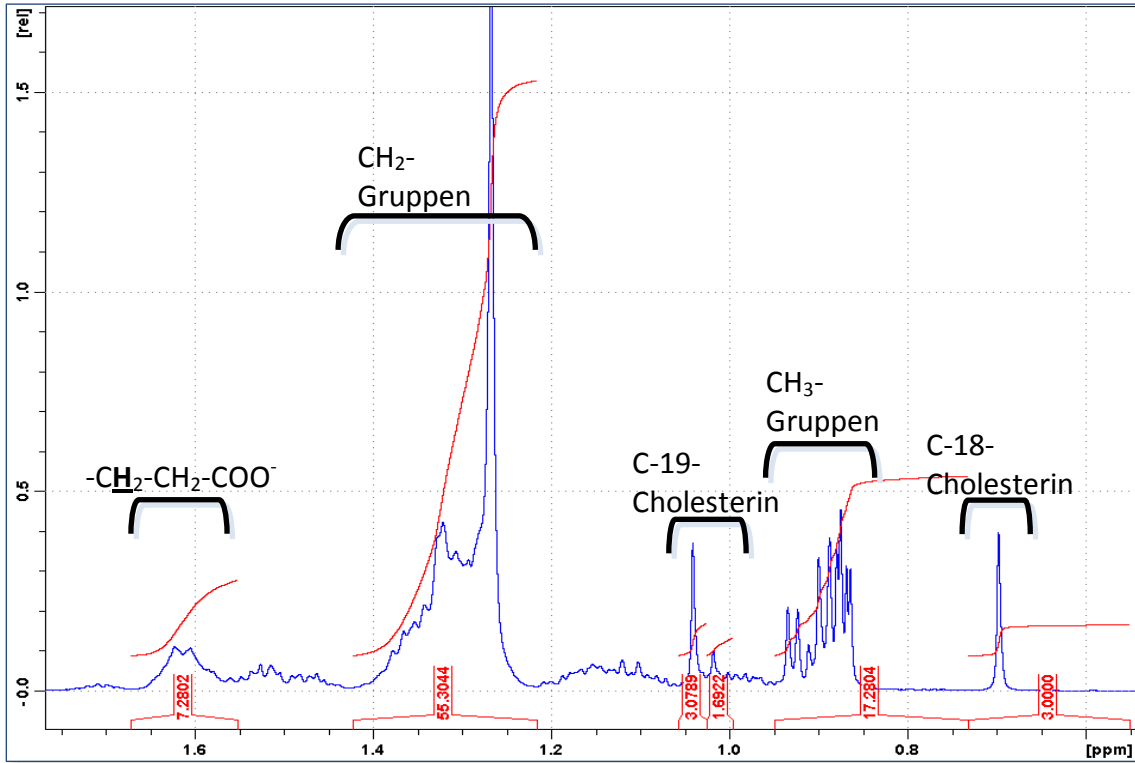
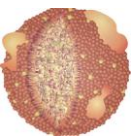
Die quantitative Analyse der NMR-Spektren setzt eine geeignete Integration in TOPSPIN voraus, die vor allem einheitlich erfolgen muss. Dazu wurde eine Integrationsdatei („intrng“) erstellt, die auf alle Spektren identisch angewendet wurde. Die Integralbereiche sind in Tab. 4.3 zusammengefasst und werden exemplarisch an einem Spektrum von extrahiertem HDL3 in Abb. 4.6 dargestellt.

	Untere Grenze der chemischen Verschiebung [ppm]	Obere Grenze der chemischen Verschiebung [ppm]
Integral 1	0.5502	0.7322
Integral 2	0.7318	0.9494
Integral 3	0.9962	1.0261
Integral 4	1.0261	1.0571
Integral 5	1.2162	1.4235
Integral 6	1.5523	1.6719
Integral 7	1.9487	2.2354
Integral 8	2.2357	2.3892
Integral 9	2.7200	2.8013
Integral 10	2.7205	2.9261
Integral 11	2.8013	2.9269
Integral 12	3.0700	3.1332
Integral 13	3.1936	3.2552
Integral 14	3.4218	3.5134
Integral 15	3.5666	3.6285
Integral 16	3.7365	3.8188
Integral 17	4.1408	4.2000
Integral 18	4.2172	4.2948
Integral 19	4.3022	4.3798
Integral 20	5.1996	5.2655
Integral 21	5.2655	5.3000
Integral 22	5.4358	5.4956
Integral 23	5.0420	5.5505
Integral 24	5.6816	5.7579
Integral 25	5.8868	5.9553

Tab. 4.3: Integralbereiche für die Quantifizierung der NMR-Spektren extrahierter Lipide: bei unterstrichenen Bereichen wurde eine separate Baseline-Korrektur vorgenommen; Gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz zg bei 293 K und einer zusätzlichen Relaxationszeit (d1) von mindestens 10 s in einem 2:1-Gemisch aus Chloroform-d (+ 0,03 Vol% TMS) und Methanol-d4

Grundsätzlich wurden die Integrale so gewählt, dass sich ihre Grenzen in lokalen Minima befanden. Dadurch wurden Überlappungsfehler minimiert. In der Umgebung dominanter Signale wurde der gewünschte Signalbereich vergrößert und die Baseline manuell korrigiert, um den Einfluss der Nachbarsignale zu verringern.

Da Cholesterin Signale über einen weiten Frequenzbereich aufweist, wurden die NMR-Spektren von Cholesterin und Cholesterylpalmitat als Gesamtspektrum subtrahiert (siehe Abb. 4.10 in Kapitel 4.1.2.3). Dazu wurden die Signale derart integriert, dass die entsprechenden Signalbereiche mit denen der extrahierten Proben übereinstimmten.



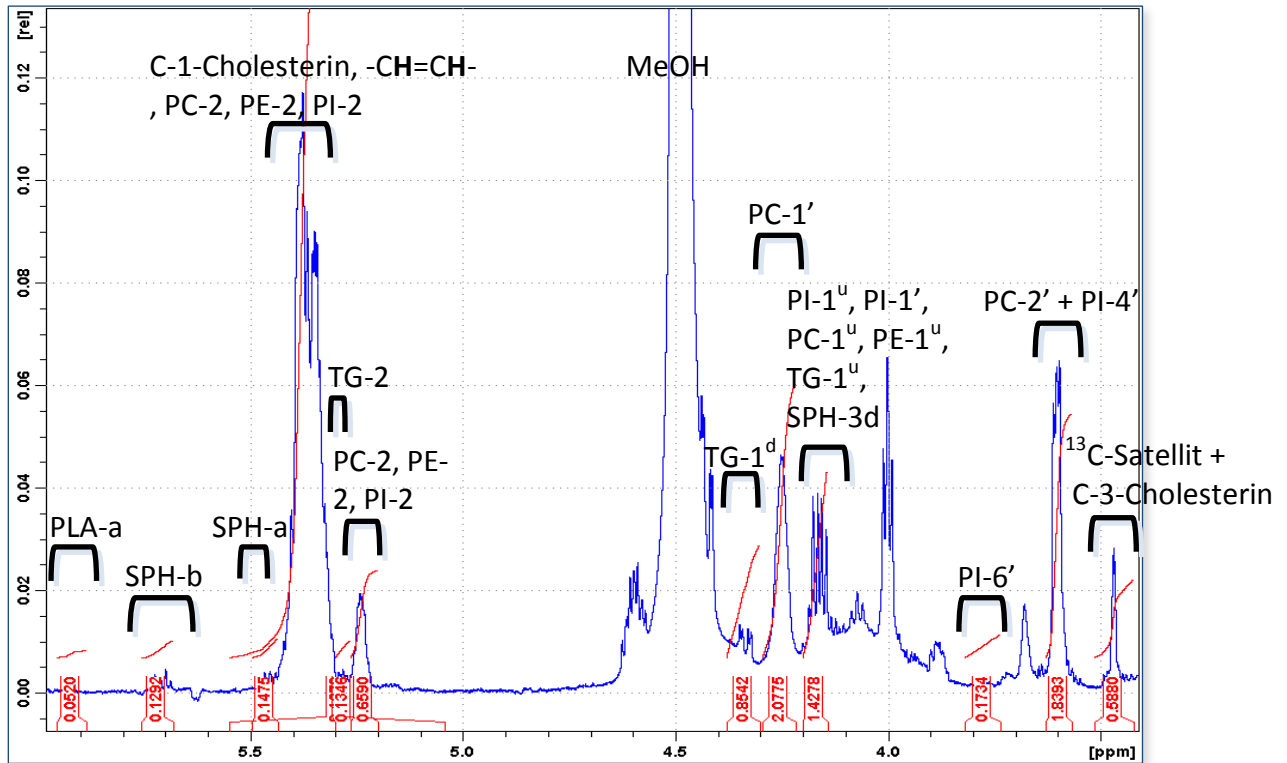
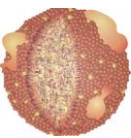


Abb. 4.6: Integralbereiche für die Quantifizierung, angewendet auf ein NMR-Spektrum von extrahiertem HDL3: die Probe wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert und anschließend nach der Methode in Kapitel 3.2.5 extrahiert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz zg bei 293 K und einer zusätzlichen Relaxationszeit (d_1) von 5 s (für detaillierte Messbedingungen siehe auch Kapitel 3.3.1); 500 μ L Probe enthielten die aus 500 μ L HDL3 extrahierten Lipide in einem 2:1-Gemisch aus Chloroform- d (+0,03 Vol% TMS) und Methanol- d_4 ; für Details zur Nomenklatur siehe Tab. 4.4; auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung in ppm angegeben, auf der y-Achse die relative Intensität

Die Gesamtmenge an Cholesterin wurde anhand der C-18-CH₃-Gruppe bei 0.69 ppm bestimmt, da diese Frequenz separiert von sämtlichen anderen Signalen liegt^{24, 45}. Das Spektrum von Cholesterin und Cholesterinester unterscheidet sich in mehreren Signalen, die in der Nähe der OH-Gruppe liegen. Am signifikantesten ist die Verschiebung des C-3-Protons, das an demselben Kohlenstoffatom gebunden ist wie der Alkohol des Cholesterins (3.47 ppm) beziehungsweise der veresterte Fettsäurerest des Cholesterinesters (4.60 ppm). Allerdings befinden sich beide Signale in der Nähe von Lösungsmittelfrequenzen und können somit nicht quantitativ erfasst werden. Daher wurden die Signale der C-19-CH₃-Gruppe herangezogen, die für Cholesterin bei 1.02 ppm und für Cholesterinester bei 1.04 ppm liegen und durch keine störenden Signale außer die des Cholesterins selbst überlagert werden²⁴ (siehe Abb. 4.10). Um das Verhältnis von Cholesterin zu Cholesterinester zu bestimmen, wurden die Integrale der Standardspektren im Bereich der C-19-CH₃-Gruppen mit den jeweiligen Integralen des Serumlipid-Spektrums verglichen und mit Hilfe eines in Excel integrierten Makros



(Solver) solange variiert, bis der Fehler für beide Integralbereiche im Vergleich zu dem Gesamtspektrum identisch war. Anschließend wurden die Standardspektren von Cholesterin und Cholesterinester subtrahiert, um die Quantifizierung anderer Signale zu ermöglichen. In Tab. 4.4 befindet sich eine Auflistung, welche Integrale zur Bestimmung der jeweiligen Lipidklassen verwendet wurden.

Int	Mittlere Chemische Verschiebung [ppm]	Chemische Bindung	Bestimmung der Lipidklassen
1	0.6412	C / CE (C-18)	Menge an Gesamtcholesterin
2	0.8406	C / CE (C-21, C-26, C-27) / FS (-CH ₃)	CH ₃ -Gruppen (Fettsäuren aus CE, TG, PL, SL und PLA, zusätzlich Seitenketten von SL und PLA)
3	1.0112	C (C-19)	Verhältnis Cholesterin (C) zu Cholesterinester (CE)
4	1.0416	CE (C-19)	
5	1.3199	C / CE (C-16, C-20, C-22, C-23) / FS (-CH ₂)	Abschätzung der durchschnittlichen Fettsäurekettenlänge
6	1.6626	C / CE (C-7, C-8, C-11, C-15, C-25) / FS (-CH ₂ -CH ₂ -COO ⁻)	Menge an Gesamtfettsäureresten
7	2.0920	C (C-4) / FS (-CH ₂ -CH=CH-)	Doppelbindungen der Fettsäurereste (wegen Verunreinigung ist Rückrechnung aus Doppelbindungs-Protonen nötig)
8	2.3390	C / CE (C-4) / FS (-CH ₂ -COO ⁻)	Menge an Gesamtfettsäureresten (Kontrolle)
9	2.7606	FS (-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-)	Abschätzung von Gehalt und Verhältnis an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (zweifach ungesättigt und mehrfach ungesättigt separiert)
10	2.8233	FS (-CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x) / FS (-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-)	
11	2.8641	FS (-CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x)	
12	3.1016	PE (PE-2')	Ethanolamin-Kopfgruppe (PE)
13	3.2244	SM (-Cholin) / PC (-Cholin) / MeOH- ¹³ C-Satellit	Cholin-Kopfgruppe (hauptsächlich PC/SM, gegeneinander verschoben)
14	3.4676	MeOH- ¹³ C-Satellit / C (C-3)	
15	3.5975	PC (PC-2') / PI (PI-4')	PC und PI (Kontrolle)
16	3.7776	PI (PI-6')	Inositol-Kopfgruppe (PI)
17	4.1704	PI (PI-1 ^u , PI-1') / PC (PC-1 ^u) / PE (PE-1 ^u) / TG (TG-1 ^u) / SPH (SPH-3d)	PI, PC, PE, TG und SPH (Kontrolle)
18	4.2560	PC (PC-1')	Cholin-Kopfgruppe (PC/SM) (Kontrolle)
19	4.3410	TG (TG-1 ^d)	Triacylglycerid (TG)
20	5.2326	PC (PC-2) / PE (PE-2) / PI (PI-2)	PC, PE und PI (Kontrolle)

21	5.2828	TG (TG-2)	TG (Kontrolle)
22	5.3481	C / CE (C-1) / FS (-CH=CH-) / PC (PC-2) / PE (PE-2) / PI (PI-2)	Abschätzung des Gehalts an ungesättigten Fettsäuren
23	5.4657	SL (SPH-a)	Sphingosin (Kontrolle)
24	5.7198	SL (SPH-b)	Sphingosin (SPH)
25	5.9210	PLA (PLA-a)	Plasmalogen (PLA)

Tab. 4.4: Zuordnung der Integralbereiche (Int) der Quantifizierung zu den Lipidklassen: Spalte 1 bezeichnet die Integrale, die in Tab. 4.3 beschrieben sind, in Spalte 2 sind die mittleren chemischen Verschiebungen dazu angegeben; hochgestelltes d und u bezieht sich auf diastereotope CH₂-Protonen, die ein Signal mit geringerer Frequenz (u) und eines mit höherer (d) besitzen

Grundsätzlich wurden Mono- und Diacylglyceride vernachlässigt, da sie in keiner der extrahierten Proben in detektierbaren Mengen vorlagen. Außerdem wurde keine separate Unterscheidung in Ceramide und Lysoverbindungen getroffen, bei denen bestimmte OH-Gruppen frei und somit nicht mit Fettsäuren verestert vorliegen (Abb. 4.7).

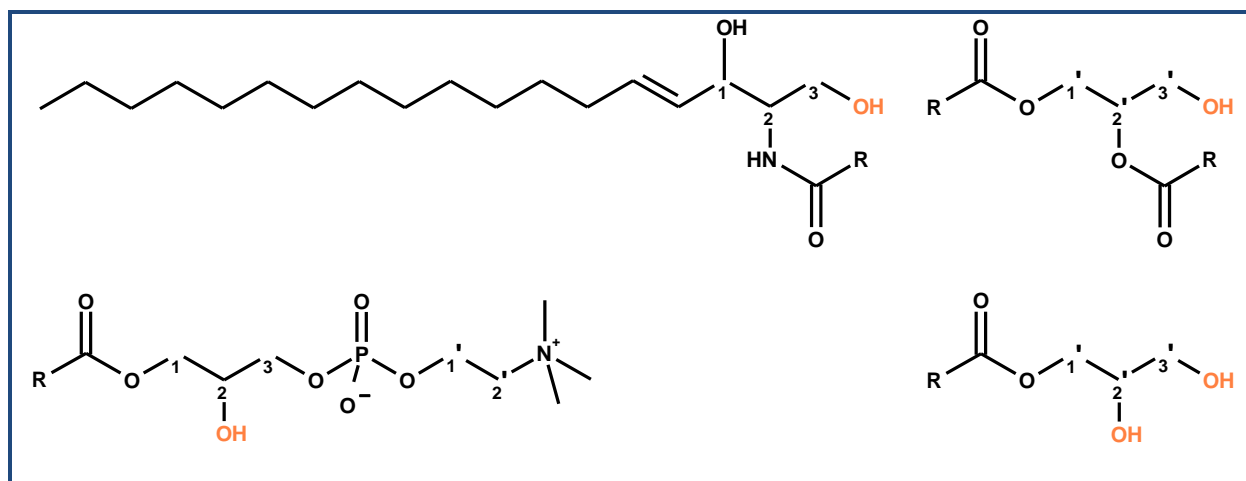


Abb. 4.7: Molekülstrukturen der nicht berücksichtigten Lipide: Ceramid (links oben), Lyso-Phosphatidylcholin (links unten), Diacylglycerid (rechts oben) und Monoacylglycerid (rechts unten)

Sofern sich in gewissen Bereichen überlappende Signale von unterschiedlichen Substanzen befanden, wurde versucht, den Anteil der störenden Signale heraus zu rechnen. Dies war zum Beispiel bei den CH₃-Gruppen des Cholins der Fall. Hier lag ebenfalls die Resonanzfrequenz der ¹³C-Satelliten des Lösungsmittelsignals. Da man aber davon ausgehen kann, dass diese zu beiden Seiten eines Signals mit gleicher Intensität auftreten, konnte das Integral der hochfeldverschobenen Seite separat berechnet werden. Dieses überlappte allerdings seinerseits mit dem C-3-Proton des Cholesterins, was wiederum durch das Standardspektrum korrigiert werden konnte (Abb. 4.8).

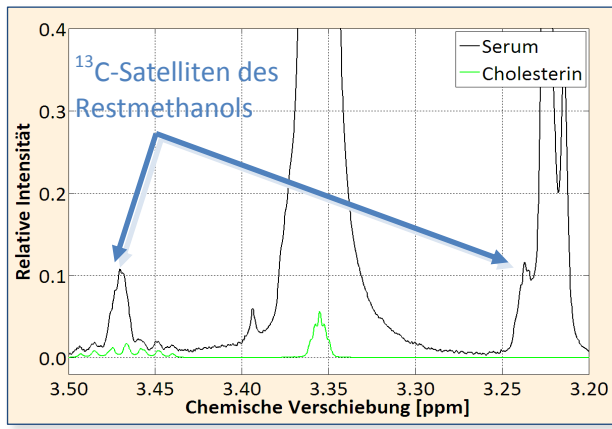
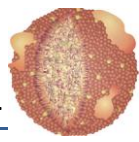


Abb. 4.8: NMR-Spektrum von extrahiertem Serum: Im Bereich der Cholin-CH₃-Gruppen (3.22 ppm) überlagert der ¹³C-Satellit des Restmethanols (3.24 ppm). Symmetrisch dazu überlappt der zweite ¹³C-Satellit (3.47 ppm) mit dem C-4-Proton des Cholesterins; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.10

Eine genaue Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung ist prinzipiell nicht möglich, da es mehr als nur eine Kombinationsmöglichkeit anhand der erhaltenen Daten gibt. Allerdings wurde versucht, eine Abschätzung vorzunehmen. Dazu wurden die Signale der Fettsäuren in sechs Gruppen eingeteilt (Tab. 4.5) und die entsprechenden Integrale nach Abzug der Anteile der übrigen Lipidklassen bestimmt.

Int	Mittlere Chemische Verschiebung [ppm]	Chemische Bindung
2	0.8406	-CH ₃
5	1.3199	-CH ₂ -
7	2.0920	-CH ₂ -CH=CH-
9	2.7606	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-
11	2.8641	-CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x
22	5.3481	-CH=CH-

Tab. 4.5: Zuordnung der Integralbereiche (Int) der Quantifizierung für die Abschätzung der Fettsäurezusammensetzung (siehe Tab. 4.3)

Zudem wurden die Hauptvertreter der zu erwartenden Fettsäuren in dieselben Kategorien eingeteilt und ihre Protonenanzahl im betrachteten Frequenzbereich aufgetragen (Tab. 4.6). Die gängige Nomenklatur bezeichnet dabei zuerst die Länge der Kohlenstoffkette und anschließend die Anzahl der Doppelbindungen, zum Beispiel 18:1 für Ölsäure (Abb. 4.12 auf S. 57f).

Int	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	24:1	18:2	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6
2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	24	28	32	36	40	20	32	14	12	6	0	4	0
7	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	2
9	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	8	8	10
22	0	0	0	0	0	2	2	4	6	8	10	10	12

Tab. 4.6: Protonenanzahl der Hauptvertreter der Fettsäuren im Bereich der ausgewählten Integrale (Int) aus Tab. 4.5 für die relevanten Integrale (siehe Tab. 4.3)

Anhand dieser Werte wurden nun mit einem in Excel integrierten Makro (Solver) die Verhältnisse der hauptsächlich vertretenen Fettsäuren so lange variiert bis die Summe die prozentuale Verteilung der diversen Fettsäuren ergab. Da es mehr als nur eine Lösung für das Problem gibt, wurden als Startwerte bereits biochemisch sinnvolle Werte eingesetzt²⁶. Die Optimierung wurde so lange durchgeführt, bis der Fehler der Abweichung weniger als 1% betrug.

4.1.2.2 BESTIMMUNG DER T_1 -ZEITEN DER EXTRAHIERTEN LIPIDE

Eine quantitative Bestimmung der Lipidzusammensetzung ist prinzipiell nur möglich, wenn gewährleistet ist, dass allen Spins ausreichend viel Zeit zur Verfügung steht, um wieder zurück in den Ausgangszustand zu relaxieren. Es wurden daher T_1 -Zeit-Messungen von extrahierten Lipiden aus Serum durchgeführt. Dazu wurden Inversion Recovery-Experimente mit variablen Wartezeiten von 0.05 s bis 5 s aufgenommen. In Abb. 4.9 sind die gemessenen Spektren dargestellt, außerdem die berechneten Fitkurven einiger signifikanter chemischer Verschiebungen und die entsprechenden daraus berechneten T_1 -Werte.

Bei 0.69 ppm findet man ausschließlich die C-18-CH₃-Gruppen des Cholesterinmoleküls, bei 3.20 ppm die CH₃-Gruppen der Cholin-Kopfgruppe. Bei 1.26 ppm tragen die Signale diverser Moleküle zum Gesamtsignal bei, es dominieren allerdings die CH₂-Gruppen der Fettsäurereste, die sich nicht in Nachbarstellung zu einer Doppelbindung oder Säuregruppe befinden. Da die berechneten T_1 -Zeiten des gesamten Frequenzbereichs nie mehr als 1.5 s betrugen, wurden die Messungen der Extrakte mit einer Wartezeit von mindestens 5 s durchgeführt.

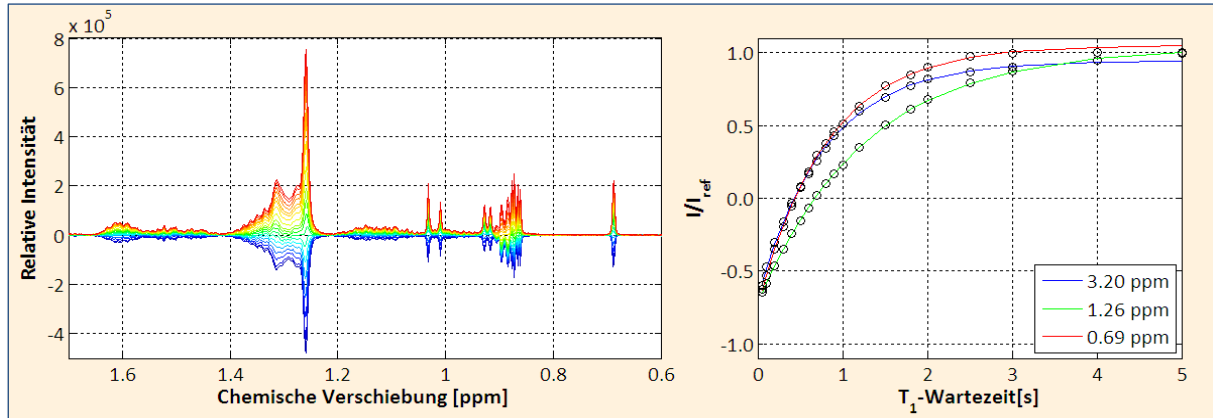
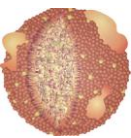


Abb. 4.9: Bestimmung der T_1 -Zeiten von extrahierten Lipiden aus Serum: die Probe wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert und anschließend nach der Methode in Kapitel 3.2.5 extrahiert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz $t1ir$ bei 293 K; 500 μ L Probe enthielten die aus 500 μ L Serum extrahierten Lipide in einem 2:1-Gemisch aus Chloroform- d (+0,03 Vol% TMS) und Methanol- d_4 ; **links:** Gemessene Einzelspektren mit variabler Wartezeit von 0.05 s (blau) bis 5 s (rot); **rechts:** Kurvenverlauf der Intensitäten im Signalmaximum ausgewählter chemischer Verschiebungen, verwendete Fitfunktion: $I(t) = I_0 (1 - (1 - \cos \alpha) \exp(-t/T_1))$

Berechnete T_1 -Zeiten von Serum

Cholin : 3.20 ppm: $T_1 = (0.80 \pm 0.03)$ s

CH₂: 1.26 ppm: $T_1 = (1.27 \pm 0.02)$ s

CH₃: 0.69 ppm: $T_1 = (0.82 \pm 0.02)$ s

4.1.2.3 ZUORDNUNG DER NMR-SIGNALE DER EXTRAHIERTEN LIPIDE

Um eine genaue Zuordnung der Lipidsignale zu gewährleisten, wurden reines Cholesterin, Cholesterylpalmitat, 1,2-Dioctyl-sn-glycero-3-phosphocholin und 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerin bei identischen Bedingungen gemessen (Abb. 4.10). So konnten die meisten der Signale sicher identifiziert werden.

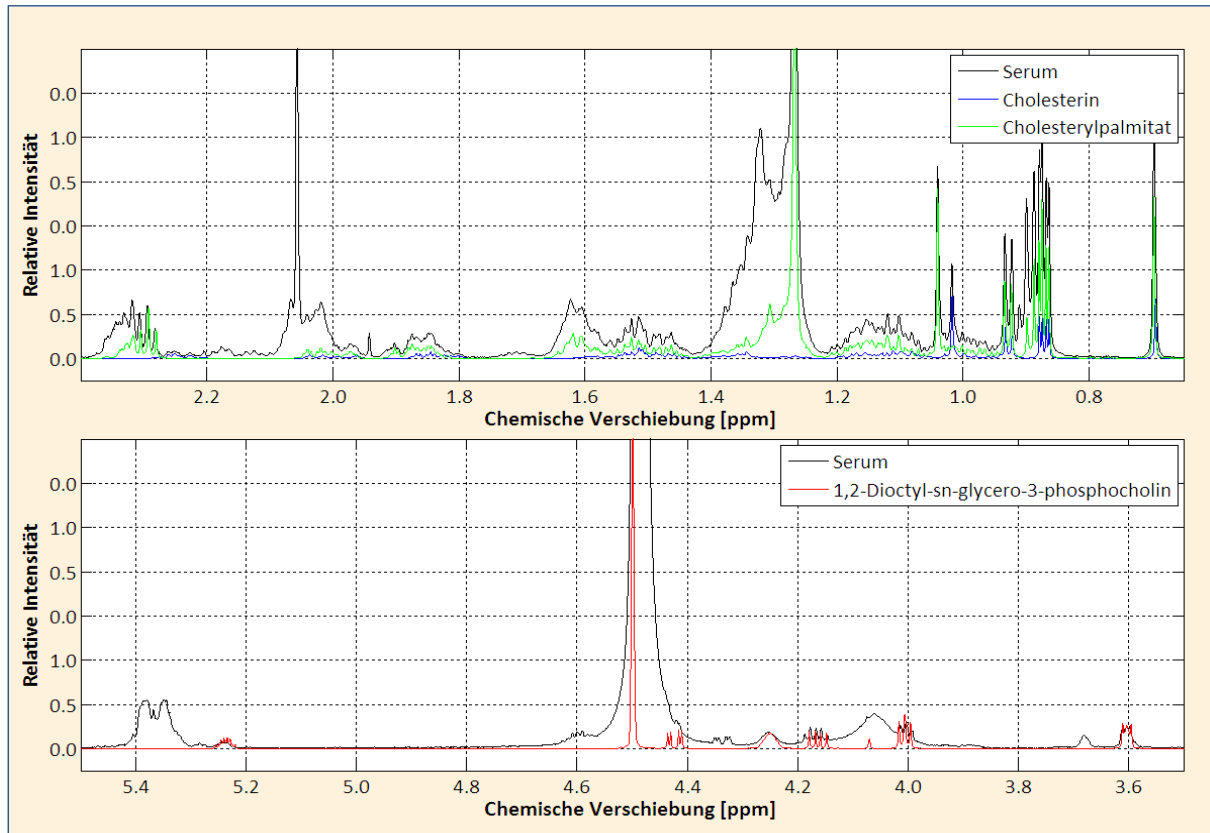
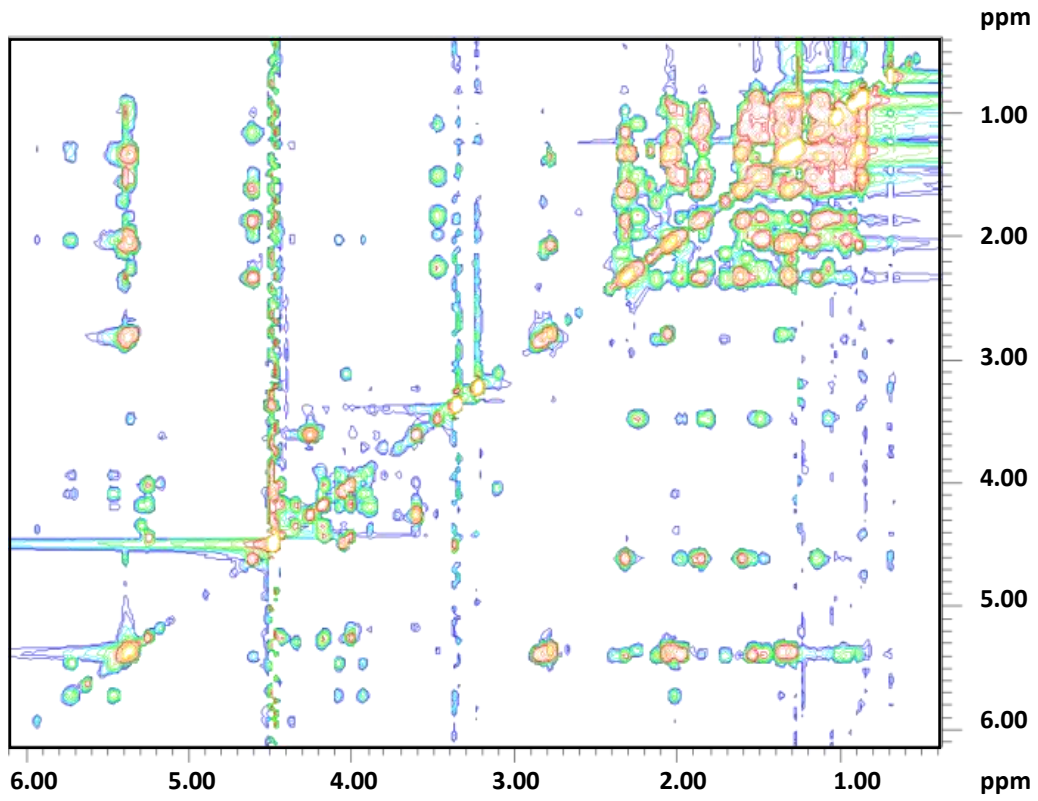
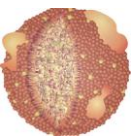
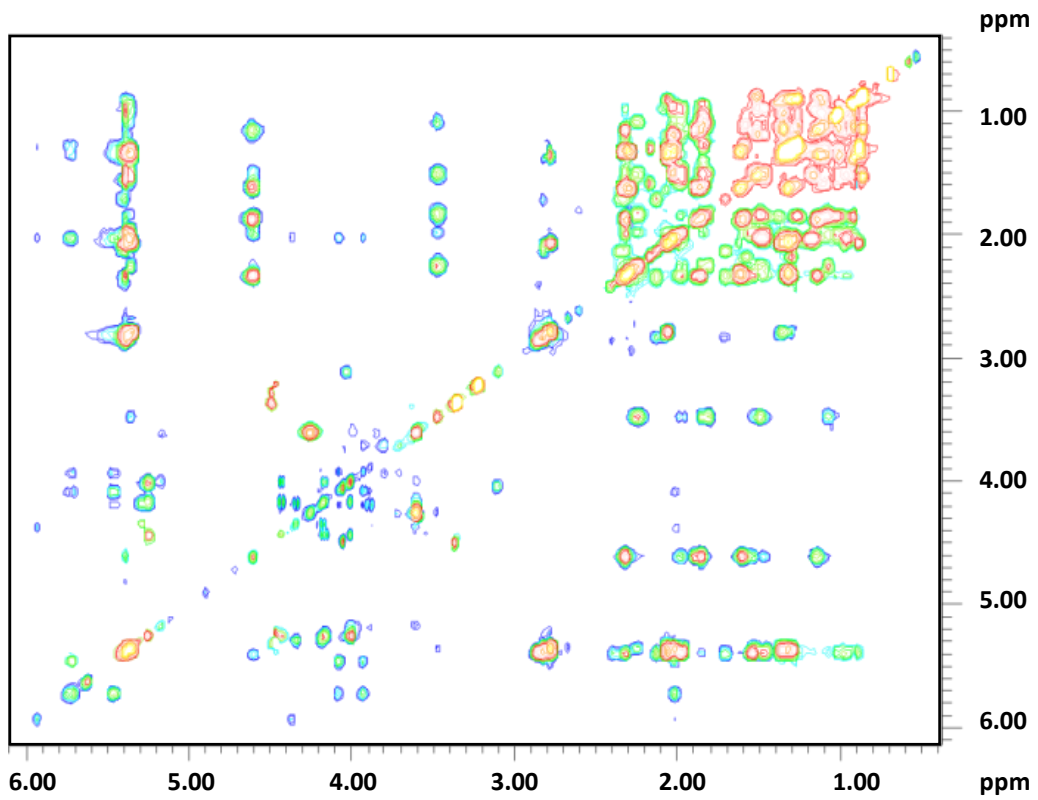


Abb. 4.10: NMR-Spektren von Reinsubstanzen: Serum wurde nach der Methode in Kapitel 3.2.5 extrahiert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz zg bei 293 K und einer zusätzlichen Relaxationszeit (d_1) von 10 s (Reinsubstanzen) oder 12 s (Serumextrakt) (für detaillierte Messbedingungen siehe auch Kapitel 3.3.1); 500 μ L Probe enthielten ca. 50-100 mg Reinsubstanz in einem 2:1-Gemisch aus Chloroform- d (+ 0,03 Vol% TMS) und Methanol- d_4 ; extrahierte Lipide aus Serum (schwarz), Cholesterin (blau) und Cholesterylpalmitat (grün) (oben); extrahierte Lipide aus Serum (schwarz) und 1,2-Dioctyl-sn-glycero-3-phosphocholin (blau) (unten); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhe des C-18-Peakmaximums (0.68 ppm) von extrahierten Lipiden aus Serum auf 1.0 normiert, die Signalintensität der Lipidstandards wurde anhand der Berechnung in Kapitel 4.1.2.4 angeglichen

Zusätzlich wurden 2D-Spektren von Serum-, LDL- und HDL-Extrakten aufgenommen, um fehlende Signale zu bestimmen. Die Lipidzusammensetzung von LDL ist hierbei am aussagekräftigsten, da einzelne Lipidklassen weniger stark überwiegen und somit andere weniger überlagern, die in geringerer Menge vorliegen (Abb. 4.11).



2D-TOCSY von extrahiertem LDL



2D-TOCSY von extrahiertem LDL (bearbeitet)

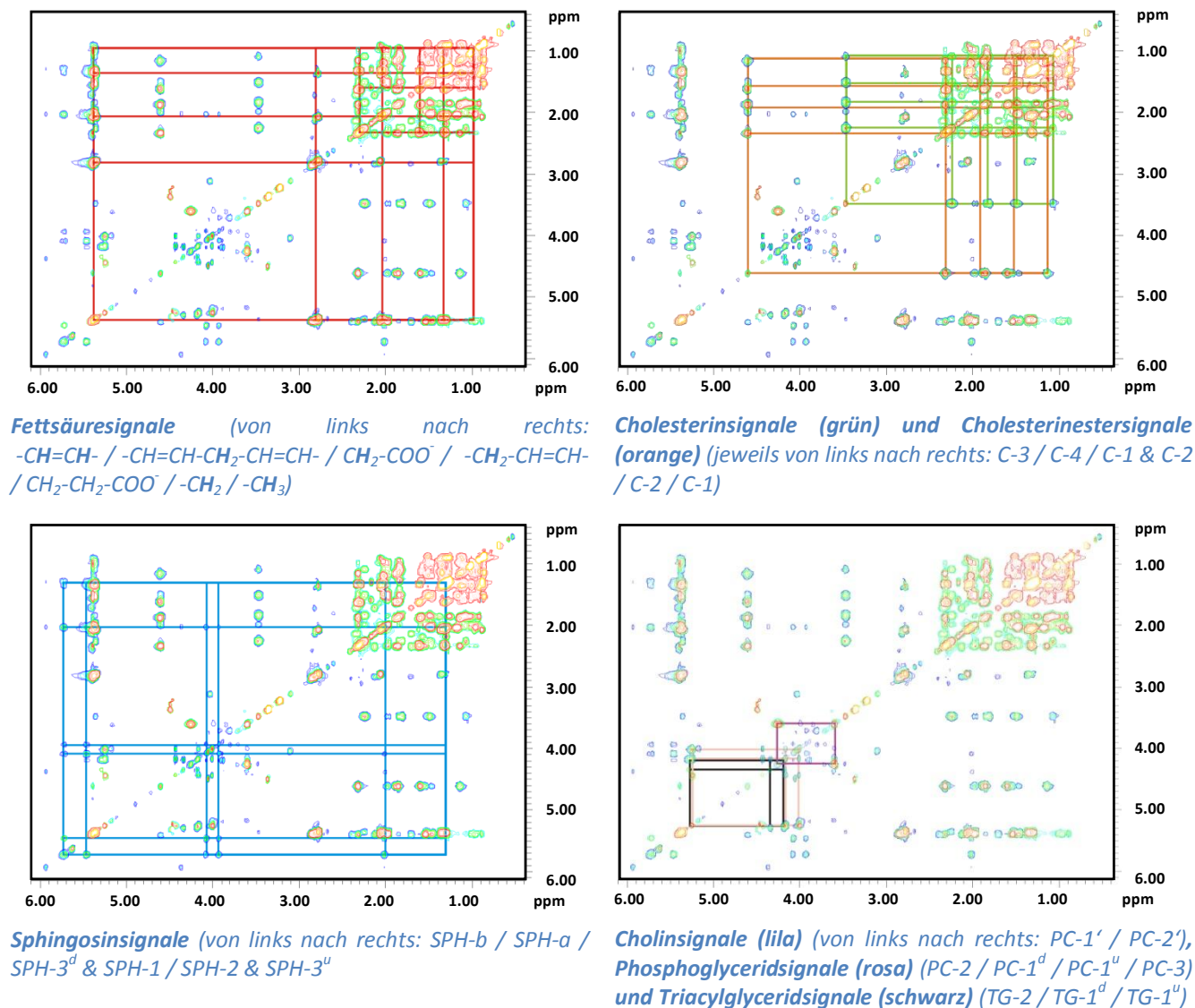
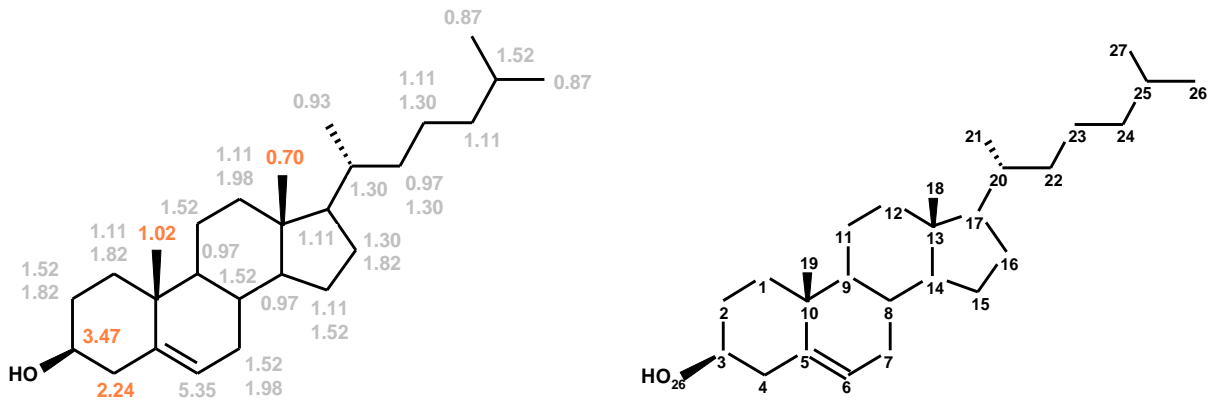
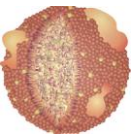
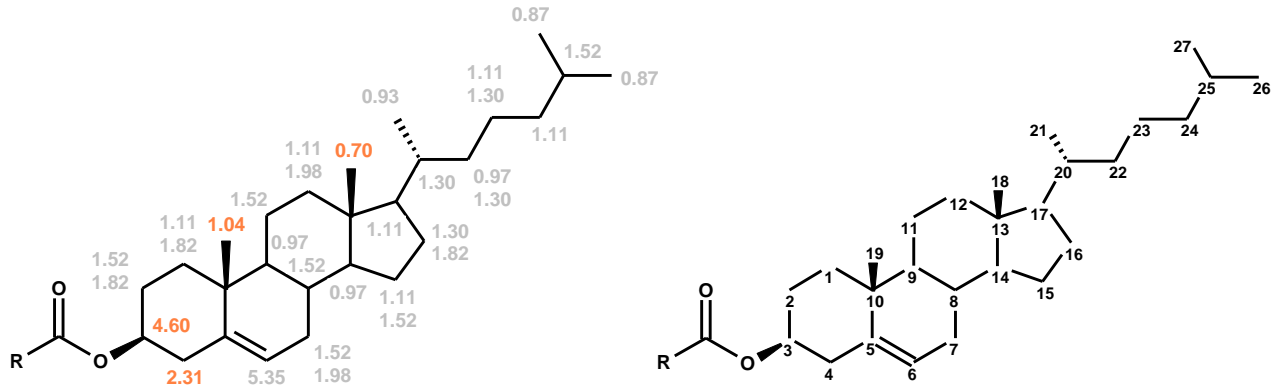


Abb. 4.11: 2D-TOCSY von extrahierten Lipiden aus LDL: die Probe wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert und anschließend nach der Methode in Kapitel 3.2.5 extrahiert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz mlevphpr bei 293 K, einer zusätzlichen Relaxationszeit (d1) von 2 s und einer Mischzeit von 60 ms; 500 μL Probe enthielten die aus 500 μL LDL extrahierten Lipide in einem 2:1-Gemisch aus Chloroform-d (+0,03 Vol% TMS) und Methanol-d₄; **vorige Seite:** Originalspektrum (**oben**) und bearbeitetes Spektrum (**unten**, hier wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit die Signale des Lösungsmittels manuell entfernt und im Bereich um 4.0 ppm dieselben Signale mit geringerer Intensität nochmals eingefügt, um sie separiert darstellen zu können); **oben links bis unten rechts:** Die dominanten Kreuzsignale des bearbeiteten Spektrums wurden mit Hilfe farbiger Rechtecke markiert.

Bereits veröffentlichte Zuordnungen von Lipidextrakten^{24, 55-58} waren sehr hilfreich und bestätigten die erhaltenen Ergebnisse (Abb. 4.12). Eine detaillierte Auflistung der zugeordneten Signale befindet sich in Kapitel 7.2 ab Seite 178. Die für die Berechnung berücksichtigten Signale aller Lipide sind in Abb. 4.12 und Abb. 4.13 in orange dargestellt.



Cholesterin



Cholesterinester (R = Fettsäurerest)

Abb. 4.12: Molekülstrukturen und chemische Verschiebungen der wichtigsten Lipidvertreter in ppm: Die für die spätere Auswertung berücksichtigten Signale sind in orange dargestellt (siehe auch nachfolgende Seite)

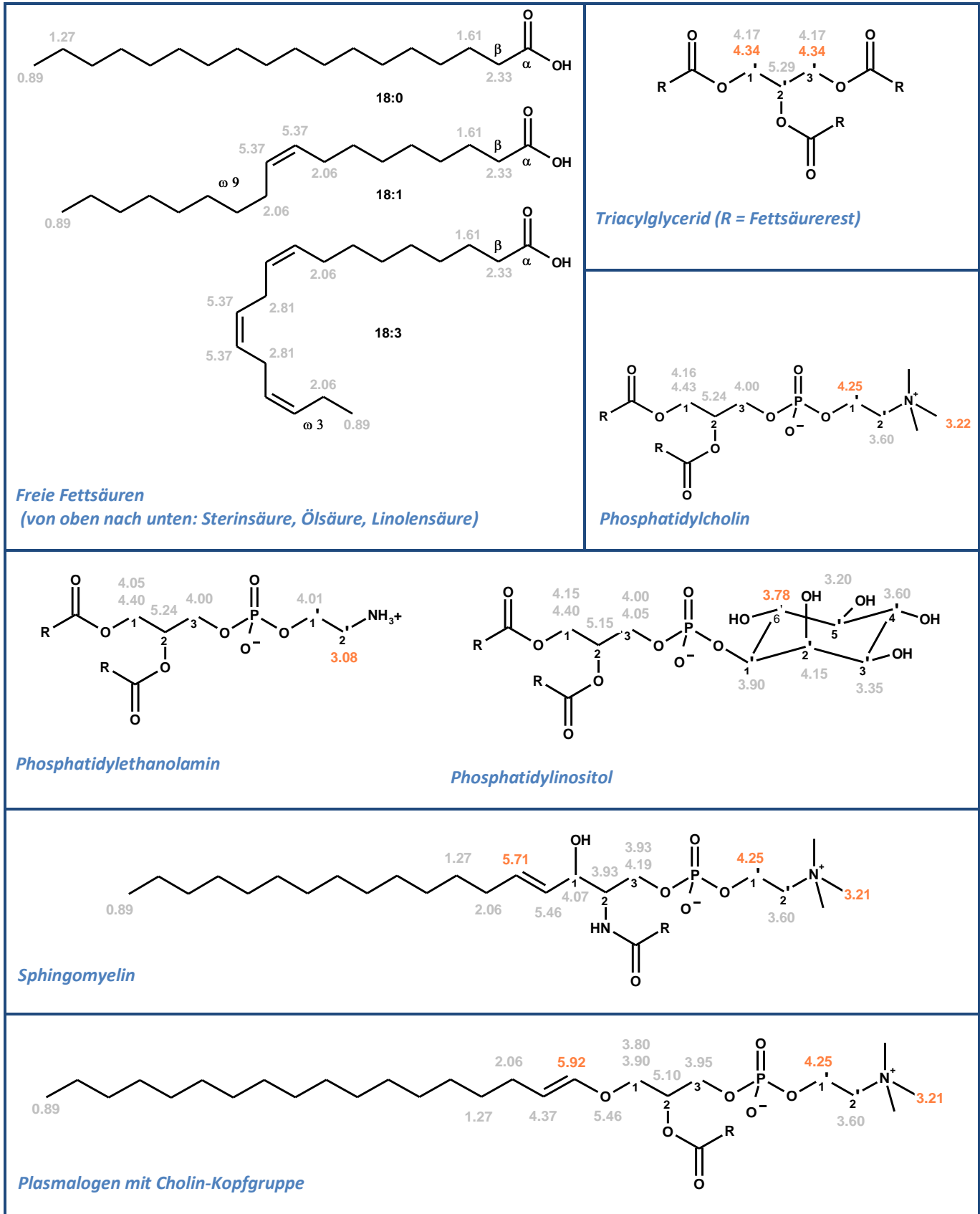
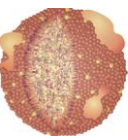


Abb. 4.13: Molekülstrukturen und chemische Verschiebungen der wichtigsten Lipidvertreter in ppm (Fortsetzung)



4.1.2.4 ZUSAMMENSETZUNG DER LIPIDE IN DEN EXTRAHIERTEN LIPOPROTEINFRAKTIONEN

Die separierten Lipoproteine aus Kapitel 4.1.1 wurden nun entsprechend der vorab diskutierten Methode extrahiert und quantifiziert. Die berechneten Verhältnisse der Lipide sind in Tab. 4.7 und die dazugehörigen NMR-Spektren in Abb. 4.14 zusammengestellt.

Die berechneten prozentualen Angaben beziehen sich auf die Anzahl der jeweiligen Moleküle im Verhältnis zur Gesamtmenge an Lipiden, die aus der Summe von Gesamtcholesterin, Sphingolipiden, Phospholipiden, Triacylglyceriden und Plasmalogenen berechnet wurde.

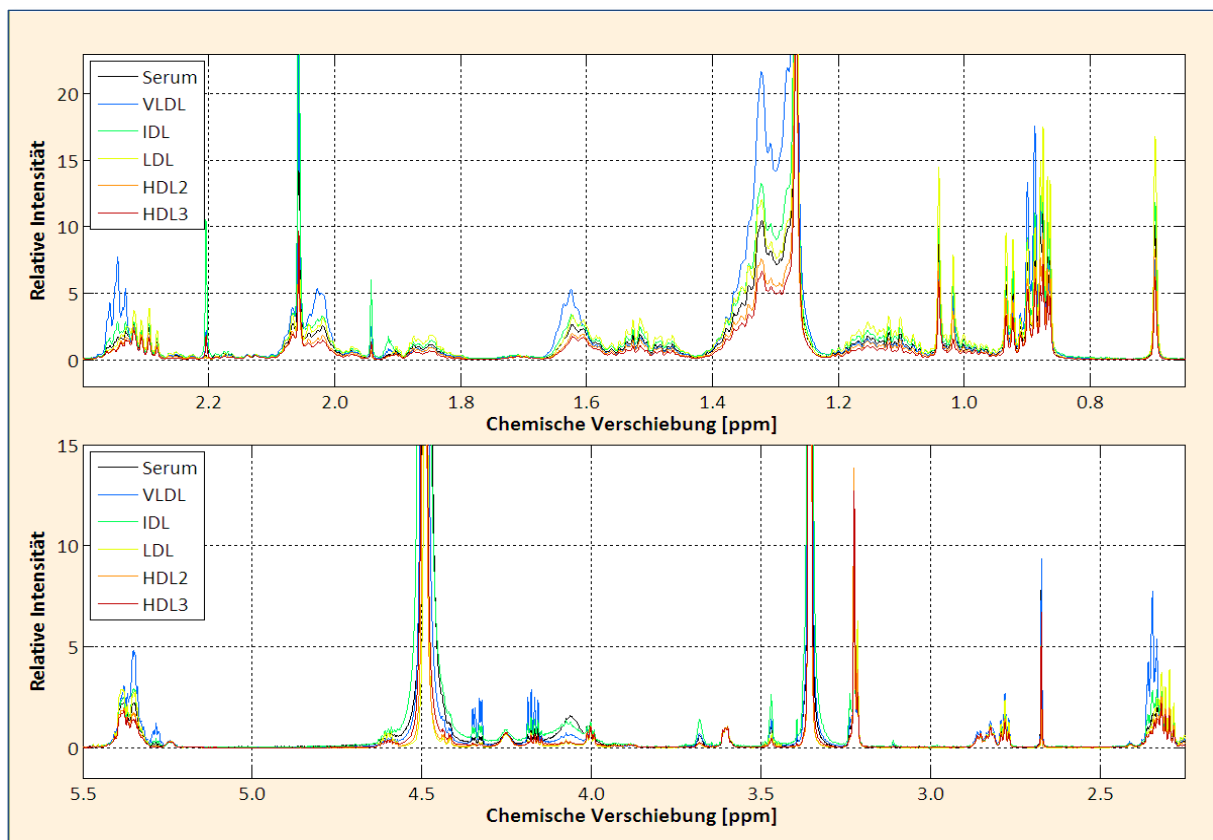


Abb. 4.14: NMR-Spektren der extrahierten Subfraktionen im Vergleich: die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert und anschließend nach der Methode in Kapitel 3.2.5 extrahiert; Gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz zg bei 293 K und einer zusätzlichen Relaxationszeit (d1) von 5 s (für detaillierte Messbedingungen siehe auch Kapitel 3.3.1); 500 μ L Probe enthielten die aus 500 μ L Serum oder Lipoproteinen extrahierten Lipide in einem 2:1-Gemisch aus Chloroform-d (+0,03 Vol% TMS) und Methanol-d₄; zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der Cholin-CH₃-Signalmaxima (3.6 ppm) auf 1.0 normiert

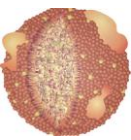
Die mengenmäßig dominierenden Komponenten sind eindeutig Cholesterin und Cholesterinester, sowie Phosphatidylcholine, Sphingomyeline und Triacylglyceride. Ethanolamin und Inositol als Kopfgruppen waren in so geringem Maße vertreten, dass der Fehler der Berechnung größer war als

der erhaltene Wert selbst, ebenso war dies bei den Plasmalogenen der Fall. Sie wurden deshalb im Folgenden vernachlässigt.

Lipid-Komponente	Serum	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Gesamtcholesterin	54.73%	35.55%	57.44%	67.08%	54.50%	46.35%
Cholesterin (C)	14.27%	13.54%	19.19%	18.64%	14.43%	7.02%
	± 0.85%	± 2.07%	± 3.39%	± 0.06%	± 0.33%	± 0.01%
Cholesterinester (CE)	40.47%	22.01%	38.25%	48.44%	40.08%	39.34%
	± 0.85%	± 2.07%	± 3.39%	± 0.06%	± 0.33%	± 0.01%
Verhältnis CE/C	2.84	1.63	1.99	2.60	2.78	5.61
Sphingolipide (SL)	6.94%	3.95%	6.52%	5.99%	5.88%	7.97%
	± 2.30%	± 0.92%	± 0.82%	± 1.78%	± 2.37%	± 0.35%
Phosphoglyceride (PG)	25.23%	21.37%	21.88%	21.98%	33.79%	38.35%
Verhältnis PG/SL	3.63	5.41	3.36	3.67	5.75	4.81
Triacylglyceride (TG)	9.02%	37.76%	13.23%	4.14%	3.52%	4.91%
Plasmalogene	4.08%	1.37%	0.93%	0.82%	2.30%	2.41%
Cholin	23.97%	19.02%	18.90%	21.07%	32.33%	36.48%
	± 0.03%	± 5.34%	± 4.98%	± 4.67%	± 3.77%	± 2.48%
Ethanolamin	0.89%	1.12%	1.39%	0.42%	0.06%	0.35%
Inositol	0.36%	1.24%	1.59%	0.50%	1.40%	1.51%
Verhältnis CE/TG	4.48	0.58	2.89	11.71	11.39	8.01
Fettsäuren	110.27%	177.39%	113.22%	92.08%	106.85%	115.58%
Gesättigte Fettsäuren	31.68%	40.32%	45.41%	39.18%	45.40%	49.23%
Durchschn. Kettenlänge (ges.)	16.49	16.36	16.96	17.86	17.68	17.05
Ungesättigte Fettsäuren	68.32%	59.59%	54.59%	60.82%	54.60%	50.77%
Einfach ungesättigt	24.11%	28.51%	13.66%	12.39%	6.96%	2.15%
Zweifach ungesättigt	31.92%	22.83%	30.32%	36.97%	34.42%	33.60%
Mehrfach ungesättigt	12.29%	8.26%	10.62%	11.47%	13.22%	15.02%
Summe	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Tab. 4.7: Ergebnisse der Einzelkomponentenanalyse aus Abb. 4.14: sämtliche Prozentangaben beziehen sich auf die Anzahl der jeweiligen Moleküle (mol-%) im Verhältnis zur Gesamtmenge an Lipiden (berechnet aus der Summe von Gesamtcholesterin, Sphingolipiden, Phospholipiden, Triacylglyceriden und Plasmalogenen)

Der Gesamtcholesteringehalt steigt von VLDL mit etwa ein Drittel über IDL hin zu LDL mit sogar zwei Dritteln an und nimmt zu kleineren Partikeln wieder ab. HDL3 besteht nur noch knapp zur Hälfte aus Cholesterin. Das Verhältnis von Cholesterinestern zu Cholesterin steigt mit schwindender Partikelgröße auf bis zu knapp 6-mal mehr Cholesterinester stetig an. Ebenso wird der Gehalt an Phospho- und Sphingolipiden tendenziell größer, wobei immer etwa 3- bis 5-mal so viel



Phosphoglyceride wie Sphingolipide enthalten sind. Der Menge an Triacylglyceriden ist in VLDL mit fast 40% am höchsten, in IDL noch etwa 15% und beträgt in den übrigen Proben weniger als 5%. Da Cholin die dominierende Kopfgruppe ist, verhält sie sich ähnlich wie die Phospho- und Sphingolipide, entspricht aber nicht genau der Summe derselben, da zum Beispiel Ceramide nicht berücksichtigt wurden, die überhaupt keine Kopfgruppe aufweisen (siehe Abb. 4.7). Fettsäuren befinden sich am häufigsten in VLDL und am wenigsten in LDL, was zum großen Teil mit der Menge der Triacylglyceride korreliert. In HDL2 und HDL3 steigt der Fettsäuregehalt allerdings aufgrund der steigenden Phosphoglyceride und Sphingolipide wieder an.

Die Werte, die für Serum berechnet wurden, bezeichnen eine Mischung der separierten Komponenten und liegen deshalb im Normalfall zwischen den Extremen.

Zieht man letztendlich die Signale der oben genannten Lipidbestandteile vom Gesamtspektrum ab, bleiben einzig die Fettsäuresignale übrig, im Speziellen also die separierten CH_3 - und CH_2 -Gruppen, die CH_2 -Gruppen α - und β -ständig zum Säurerest, sowie die CH-Gruppen der Doppelbindungen und die benachbarten und dazwischenliegenden CH_2 -Gruppen. Eine konkrete Fettsäurezusammensetzung kann man anhand der vorliegenden Daten nicht angeben, da man diverse Lösungen für das Problem bekommen kann. Allerdings wurde eine Abschätzung versucht, wie sie in Kapitel 4.1.2.1 beschrieben wurde. Wiesner et al. haben 2009 eine Aufstellung der Fettsäurezusammensetzung in verschiedenen Lipoproteinfraktionen veröffentlicht, die massenspektroskopisch gemessen wurde. Anhand dieser Daten wurden die zu erwartenden Fettsäuren als Standard verwendet und eine grobe Startzusammensetzung überschlagen. Anschließend wurde die bestmögliche Verteilung mit Hilfe einer Optimierungsroutine (siehe Seite 52) bestimmt (Tab. 4.8).

Fettsäurerest	Serum	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
16:0	23.96%	33.11%	29.61%	21.87%	27.28%	33.33%
18:0	7.72%	7.21%	11.52%	8.76%	9.07%	11.58%
20:0	0.00%	0.00%	2.67%	1.81%	2.05%	0.65%
22:0	0.00%	0.00%	1.61%	2.87%	3.03%	1.61%
24:0	0.00%	0.00%	0.00%	3.87%	3.96%	2.05%
18:1	16.14%	27.11%	11.39%	6.80%	4.82%	1.92%
24:1	7.98%	1.40%	2.27%	5.58%	2.15%	0.23%
18:2	31.92%	22.83%	30.32%	36.97%	34.42%	33.60%
20:3	2.99%	2.56%	2.83%	2.01%	0.23%	0.44%
20:4	5.05%	2.45%	2.77%	2.71%	1.02%	2.49%
20:5	2.83%	1.86%	2.17%	2.61%	4.70%	6.41%
22:5	0.57%	0.90%	2.85%	4.12%	7.21%	5.68%
22:6	0.84%	0.48%	0.00%	0.01%	0.06%	0.00%
Summe	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Fehler der Optimierung	0.8581%	0.9196%	0.0042%	0.0109%	0.0639%	0.0019%

Tab. 4.8: Abschätzung der Fettsäurezusammensetzung aus Abb. 4.14: sämtliche Prozentangaben beziehen sich auf die Anzahl der jeweiligen Moleküle (mol-%) im Verhältnis zur Gesamtmenge der Fettsäuren

Alle Partikel weisen zu ca. 40% gesättigte und zu 60% ungesättigte Fettsäuren auf. Die durchschnittliche Kettenlänge der gesättigten Fettsäure beträgt etwa 17 Kohlenstoffatome, wobei Palmitinsäure (16:0) deutlich häufiger auftritt als Stearinsäure (18:0). Ölsäure (18:1) scheint in Partikeln mit hohem Triacylglyceridanteil bevorzugt vorzukommen. Man findet sie also hauptsächlich in VLDL und IDL. Umgekehrt scheint der Gehalt an Linolsäure (18:2) bei größeren Partikeln zu sinken. Eine detailliertere Aussage kann man den Daten sicher nicht entnehmen.

4.1.2.5 VERGLEICH DER LIPOPROTEINE MIT DEN DARAUS EXTRAHIERTEN LIPIDEN

Es wurden sowohl von den extrahierten Lipiden als auch von dem ursprünglichen Serum und den jeweiligen Lipoproteinen NMR-Spektren gemessen und diese gegeneinander korrigiert (number of scans, receiver gain, nc_proc und Verdünnung der Proben, siehe Kapitel 7.1), so dass ein quantitativer Vergleich zu sehen war, welchen Anteil die Lipide am Ausgangsspektrum ausmachen (Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Der Einfluss der unterschiedlichen Wichtungen aufgrund der verschiedenen Pulsprogramme (zg und noesygppr1d) wurde nicht berücksichtigt.

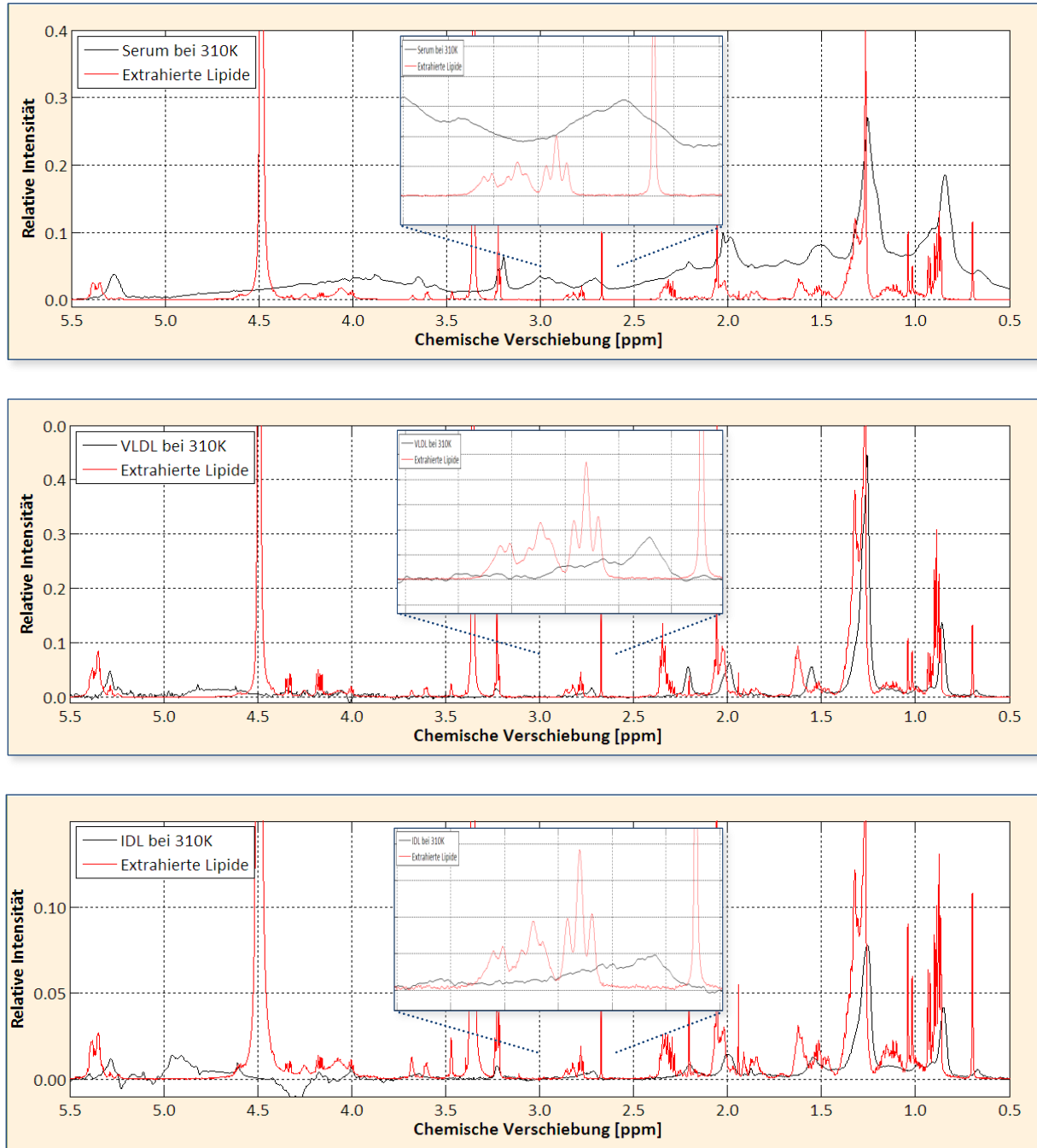
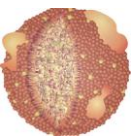


Abb. 4.15: Vergleich der NMR-Spektren von Serum, VLDL und IDL mit den daraus extrahierten Lipiden: die Spektren wurden durch Korrektur von NS, RG, nc_proc und der jeweiligen Verdünnung korrigiert (siehe Kapitel 7.1), so dass die absolute Lipidmenge in der Probe dargestellt ist, der Einfluss der unterschiedlichen Wichtung aufgrund unterschiedlicher Pulsprogramme wurde nicht berücksichtigt; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.4 und Abb. 4.14

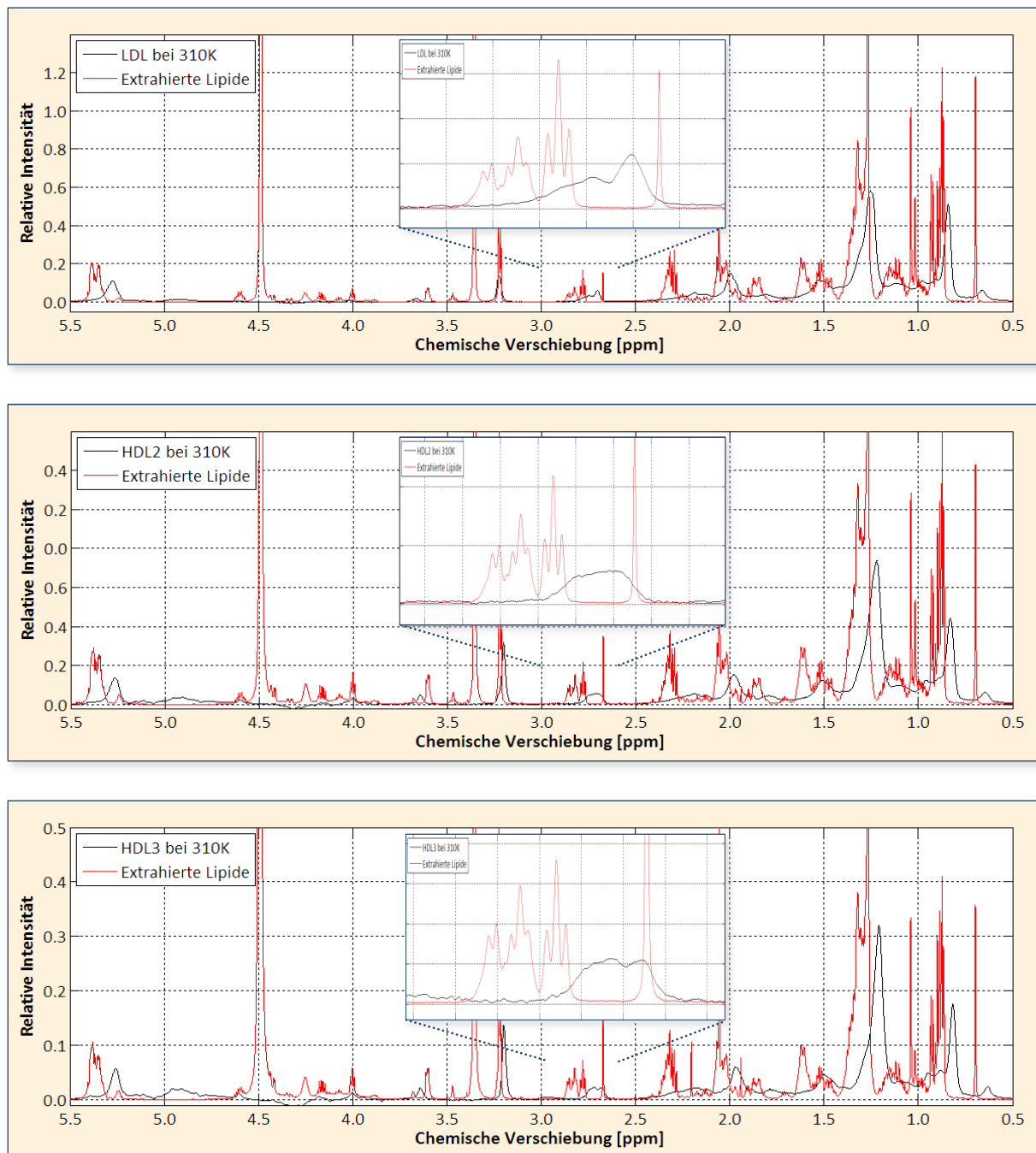
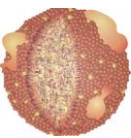


Abb. 4.16: Vergleich der NMR-Spektren von LDL, HDL2 und HDL3 mit den daraus extrahierten Lipiden: die Spektren wurden durch Korrektur von NS, RG, nc_proc und der jeweiligen Verdünnung korrigiert (siehe Kapitel 7.1), so dass die absolute Lipidmenge in der Probe dargestellt ist, der Einfluss der unterschiedlichen Wichtung aufgrund unterschiedlicher Pulsprogramme wurde nicht berücksichtigt; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.4 und Abb. 4.14



Das einzige Signal, das sowohl im wässrigen als auch im organischen Milieu von anderen Signalen separiert ist, liegt bei etwa 2.8 ppm und kann den CH₂-Gruppen zwischen je zwei Doppelbindungen in mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugeordnet werden. Die Integrale dieses Signals sind in Tab. 4.9 zusammengestellt. Das Integral von Gesamtserum wurde nicht bestimmt, da hier eine deutliche Überlagerung mit den Signalen der Proteine zu erkennen war.

Lipoprotein-Klasse	Integral der Lipidsignale innerhalb der Lipoproteine	Integral der Lipidsignale in den extrahierten Lipiden	Verhältnis der Integrale zueinander
VLDL	1.13	1.66	68.23%
IDL	0.53	0.69	76.64%
LDL	3.97	5.33	74.48%
HDL2	2.62	4.52	57.99%
HDL3	2.19	3.39	64.66%

Tab. 4.9: Integrale der CH₂-Gruppen zwischen isolierten Doppelbindungen in mehrfach ungesättigten Fettsäuren (2.7-2.9 ppm) in den NMR-Spektren aus Abb. 4.15 und Abb. 4.16

Interessanterweise war das Integral der Signale in den Lipoproteinpartikeln grundsätzlich kleiner als das in den extrahierten Lipiden, was einen Unterschied von etwa 55-75% ausmacht. Es scheint also durchaus der Fall zu sein, dass man in den gepackten Lipoproteinen aufgrund der unbeweglichen Struktur NMR-spektroskopisch nicht alle Lipide sehen kann und dass dieser Effekt bei kleineren Partikeln tendenziell höher ausgeprägt ist. Auf die Struktur der Lipoproteine soll aber im Detail erst in Kapitel 4.2 eingegangen werden.

4.1.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Zuletzt wurde das verwendete Serum mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Abb. 4.17 zeigt Serum und die einzelnen daraus isolierten Klassen VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3 bei einer einheitlichen Vergrößerung (33000 fach). Mit Hilfe einer speziellen Funktion der Software EM-MENU 4.0 konnten die Radien direkt einzeln manuell ausgemessen werden. Die gefundenen Größenbereiche sind in Tab. 4.10 angegeben (Zeile 1). Durch die Trocknung der Lipoproteine auf den Grids kann es allerdings zu einer Abflachung der Partikel kommen, wodurch der Radius eventuell größer erscheint als er in der Lösung tatsächlich ist.

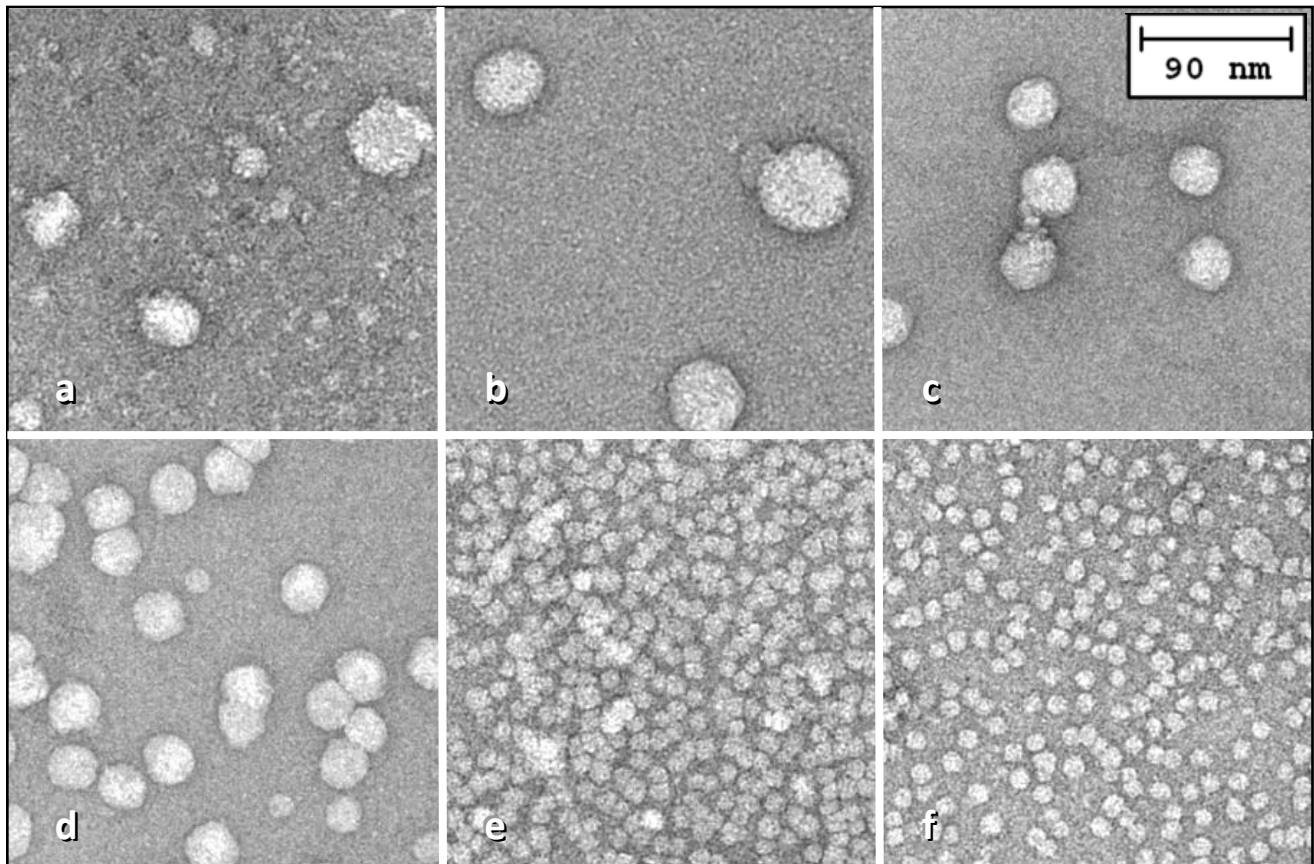
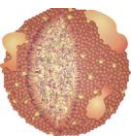


Abb. 4.17: Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von Serum und daraus separierten Lipoproteinfractionen in einheitlicher Vergrößerung (der Maßstab bezieht sich auf alle Abbildungen): a) Serum, b) VLDL, c) IDL, d) LDL, e) HDL2, f) HDL3: die Montage der Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ; die Proben wurden mit 2% UAc negativ kontrastiert; Serum, LDL, HDL2 und HDL3 wurden 1:1000 verdünnt, VLDL und IDL nur 1:100

Auch wenn neueste Erkenntnisse der Cryo-Elektronenmikroskopie LDL als diskoidale Partikel zeigen, konnten hier nur runde Partikel gesichtet werden, was auf die Probenpräparation zurückzuführen ist⁵⁹⁻⁶⁰.

Um eine Aussage über die detaillierte Größenverteilung machen zu können, wurden die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der Lipoproteinklassen mit dem Java-basierten Bildbearbeitungsprogramm ImageJ analysiert. Damit ist es möglich, automatisch Partikel zu zählen und deren Flächen zu bestimmen. Voraussetzung für ein sinnvolles Ergebnis ist die Segmentierung der Grauwerte im Bild. Dazu wurden die Bilder in Helligkeit und Kontrast optimal eingestellt und invertiert, so dass die Partikel als dunkle Kreise auf hellem Hintergrund zu sehen waren. Anschließend wurde das Rauschen und eventuell überlagerte graduelle Schattierungen mit einem Bandpassfilter (kombinierter Lowpass- und Highpass-Filter im Fourierraum) entfernt. Mit Hilfe eines



Schwelwertverfahrens konnten nun die Partikel von dem Hintergrund separiert und analysiert werden (Abb. 4.18). Die so bestimmten durchschnittlichen Durchmesser, die aus den Flächen berechnet wurden, sind in Tab. 4.10 in Spalte 2 zu finden.

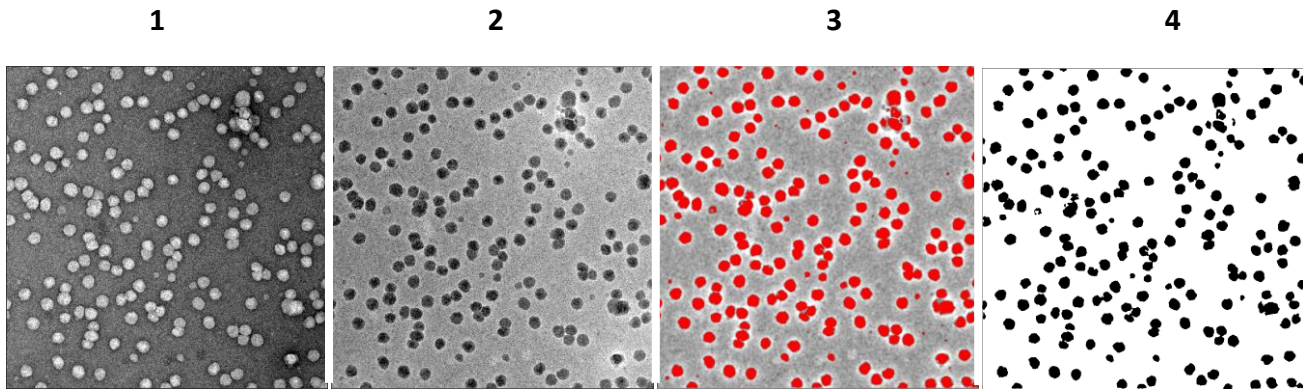
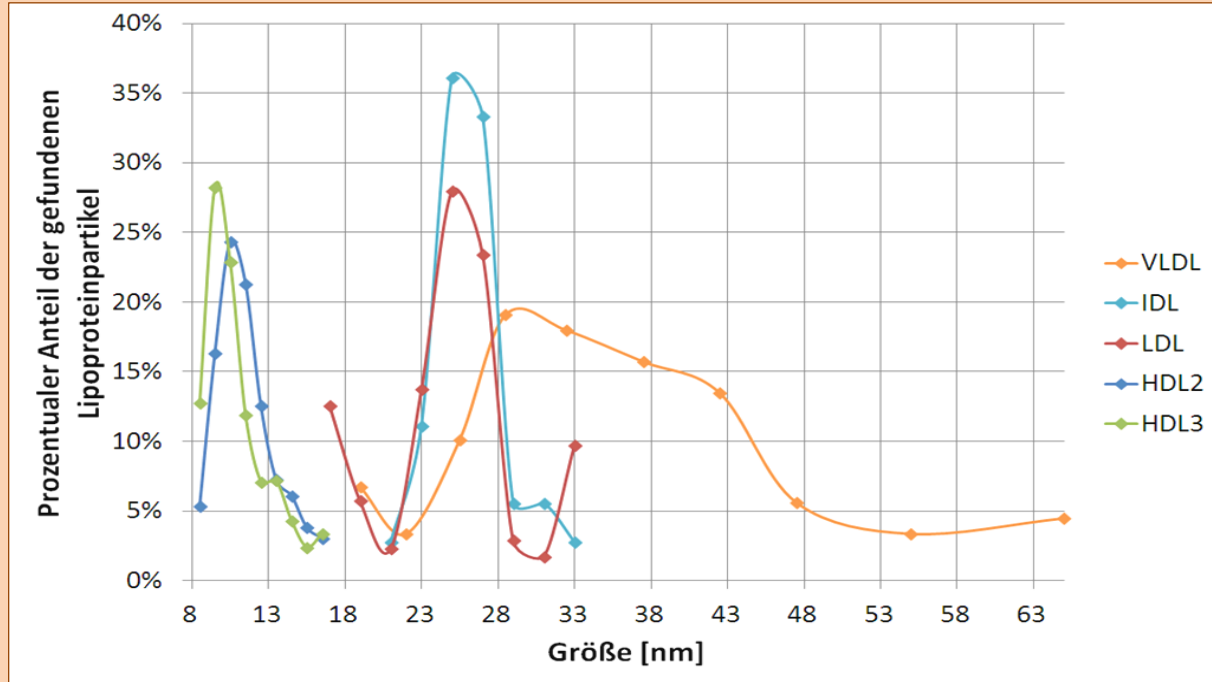


Abb. 4.18: Bestimmung der Größenverteilung in Elektronenmikroskopie-Aufnahmen mit Hilfe von Funktionen und Makros in ImageJ (am Beispiel von LDL): das Originalbild wurde in Helligkeit und Kontrast optimiert (1), invertiert und mit einem Bandbreitenfilter geglättet und entrauscht (2). Anschließend wurde ein Schwellwert gesetzt, so dass die Partikel markiert waren, nicht aber der Hintergrund (3); zuletzt wurden mit Hilfe eines Makros die Partikelgrößen analysiert

Man erhielt schließlich eine quantitative Angabe zur durchschnittlichen Größe der Partikel, die von VLDL mit etwa 35 nm bis hin zu HDL3 mit 11 nm schrittweise abnahm. In jeder Lipoproteinfraktion konnten in geringem Ausmaß auch kleinere oder größere Partikel gefunden werden, was durch die präparative Trennmethode nicht vermieden werden kann.

Lipoproteinklasse	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Manuell bestimmte Größenverteilung der Partikel [nm]	30 - 60	30 - 50	24 - 30	10 - 15	7 - 12
Durchschnittliche Größe der Partikel nach automatischer Auswertung [nm]	36.5	26.1	25.3	11.7	11.2
Standardabweichung der Größenverteilung [nm]	31.5	12.6	16.7	7.4	7.4

Graphische Darstellung



Tab. 4.10: Gefundene Größenverteilung der Lipoproteine in den separierten Fraktionen anhand der Elektronenmikroskopie-Aufnahmen aus Abb. 4.17: zum einen wurden die Partikelgrößen manuell gemessen, zum anderen mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ automatisch bestimmt (siehe Abb. 4.18); die detaillierte Größenverteilung ist zusätzlich graphisch dargestellt

Anhand der Grafik in Tab. 4.10 kann man deutlich erkennen, dass sowohl in HDL2 als auch in HDL3 dieselben Größen vorkommen, jedoch die Verteilung von HDL3 ihr Maximum bei kleinen Größen besitzt. Ebenso findet man LDL und IDL in denselben Größen. Auch hier ist das Maximum leicht verschoben. VLDL beinhaltet einige kleine Moleküle, die entweder LDL, beziehungsweise IDL, zugeordnet werden können, aber auch deutlich größere Partikel.

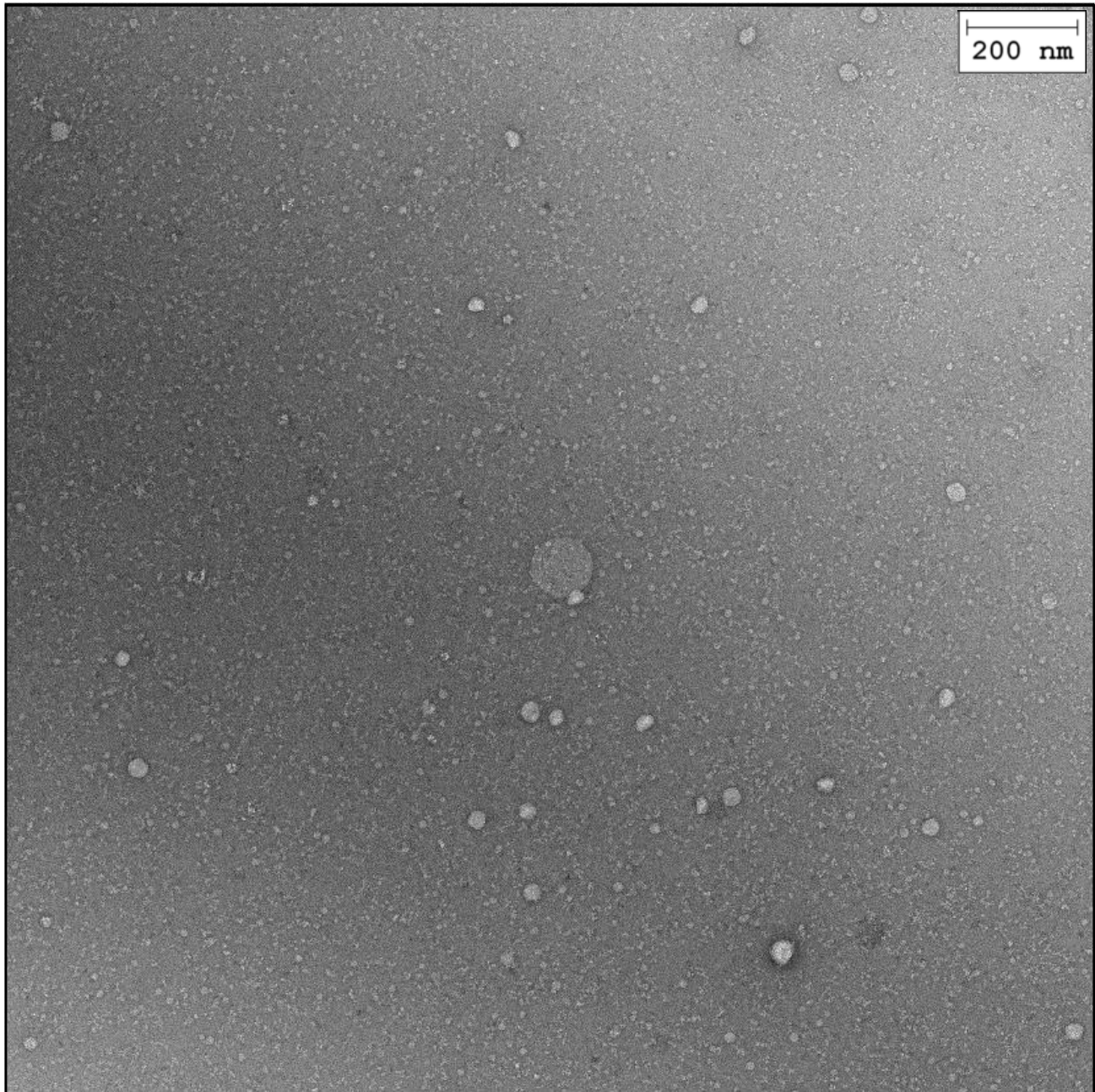
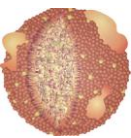


Abb. 4.19: Elektronenmikroskopie-Aufnahme von Serum: die Probe wurde 1:1000 verdünnt und mit 2% UAc negativ kontrastiert

Abb. 4.19 zeigt eine Übersichtsaufnahme von gesamtem Serum. Man kann eindeutig verschiedene Partikelgrößen sehen, die bei dieser Vergrößerung zum einen noch ausreichend gut zu erkennen sind und zum anderen durch die Anzahl der Punkte statistisch eine zufriedenstellende Aussage liefern.

Auch hier wurde versucht, eine automatische Analyse durchzuführen. Es wurden allerdings unverhältnismäßig viele kleine Partikel gefunden (Tab. 4.11), was zum einen durch die geringere

Vergrößerung und zum anderen durch die Anwesenheit der Serumproteine, vor allem Albumin und Immunglobuline, verursacht wurde, die als Rauschen im Hintergrund eine sinnvolle automatisierte Partikel-Analyse äußerst schwierig gestalten, beziehungsweise fast unmöglich machen.

Größenbereich [nm]	30-60 (VLDL+IDL)	24-30 (LDL)	7-15 (HDL)	Rest	Summe
Anzahl der gefundenen Partikel	5	17	2146	6768	8970
Relativer Anteil	0.06%	0.19%	23.92%	75.45%	100%

Tab. 4.11: Verteilung der Partikelgrößen in Serum anhand der Elektronenmikroskopie-Aufnahme aus Abb. 4.19 mit Hilfe der Makros der Bildbearbeitungs-Software ImageJ

Um eine realistische Verteilung zu erhalten, wurden deshalb mehrere Versuchspersonen gebeten, die Partikelgrößen unabhängig voneinander auszuzählen. Die Daten sind in Tab. 4.12 zusammengestellt.

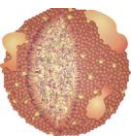
Subjektive Betrachter	○ 50 nm	○ 30 nm	○ 20 nm	○ 15 nm	○ 10 nm	○ 8 nm	Summe
Person 1	1	15	3	17	124	242	402
Person 2	1	24	3	10	43	270	351
Person 3	1	24	8	13	46	215	307
Person 4	1	21	5	6	45	316	394

Tab. 4.12: Verteilung der Partikelgrößen in Serum anhand der Elektronenmikroskopie-Aufnahme aus Abb. 4.19 aus der Sicht verschiedener Betrachter

Für die weitere Auswertung wurden für HDL die Größen von 8-15 nm zusammengefasst und für LDL die Größen von 20-30 nm. VLDL und IDL werden die Partikel mit der Größe 50 nm zugeordnet. So erhielt man folgende Aufstellung:

Subjektive Betrachter	○ VLDL+IDL	○ ○ LDL	○ ○ ○ HDL	Summe
Person 1	1	18	383	402
Person 2	1	27	323	351
Person 3	1	32	274	307
Person 4	1	26	367	394
Durchschnitt	1.0	25.8	336.8	363.5

Tab. 4.13: Zusammenfassung der Größenverteilung aus Tab. 4.12 und Einteilung in Lipoproteinklassen



4.1.4 MATHEMATISCHE FRAKTIONIERUNG VON SERUM

Es wurde schließlich noch einer alternativen Idee nachgegangen, wie die Zusammensetzung der Lipoproteine in Serum bestimmt werden könnte. Da verschieden große Partikel und Proteine unterschiedliche Beweglichkeit in der Lösung zeigen, wurden Diffusionsmessungen derselben Proben wie in den vorherigen Kapiteln angefertigt.

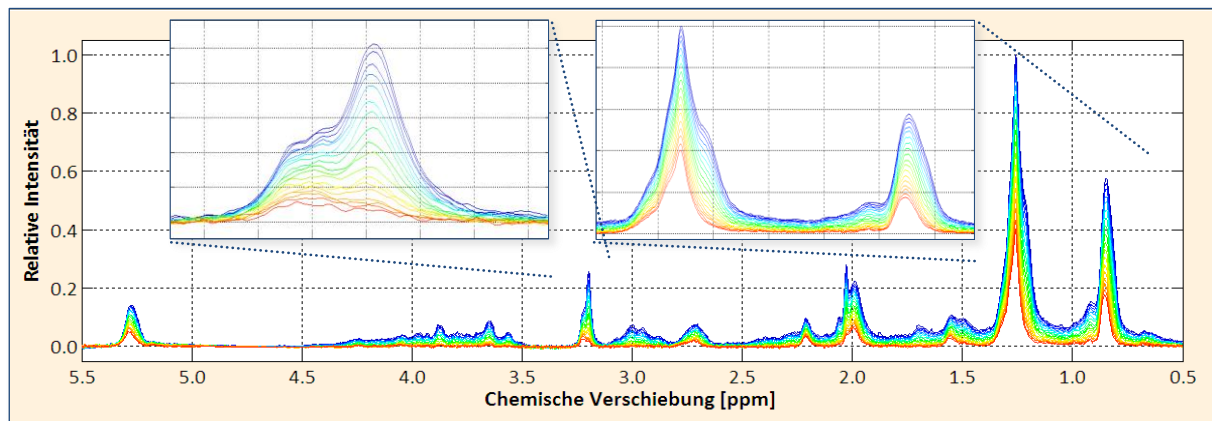


Abb. 4.20: Diffusionsspektren von Serum mit variabler Gradientenstärke von 5% (blau) bis 90% (rot) in 5%-Schritten: gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *ledbgppr2s*, einer Diffusionszeit von 50 ms und einem Gradientenpuls von 4 ms bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurde die Signalhöhe des CH_2 -Peakmaximums (1.2 – 1.3 ppm) des ersten Spektrums auf 1.0 normiert

In Abb. 4.20 kann man die Diffusionsspektren von Serum mit steigender Gradientenstärke sehen. Die höchste Signalintensität kann man bei dem Spektrum mit einer Gradientenstärke von 5% erkennen. Sukzessive Erhöhung bis hin zu 90% führt zu einem kontinuierlichen Intensitätsverlust, abhängig von der Größe der Partikel. Da größere Lipoproteinpartikel zu höheren chemischen Verschiebungen hin verschoben sind³⁵, verlieren die tieffeldverschobenen Seiten eines Signals weniger stark an Signalintensität als die entsprechend hochfeldverschobenen.

Um vorab zu klären, welche Partikel welche Diffusionskoeffizienten aufweisen, wurden von allen separierten Klassen Diffusionsmessungen identisch zu der obigen bei Serum angefertigt. Die Intensitäten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen wurden gegen die relative Gradientenstärke aufgetragen, woraus sich die Diffusionskoeffizienten berechnen ließen (Abb. 4.21).

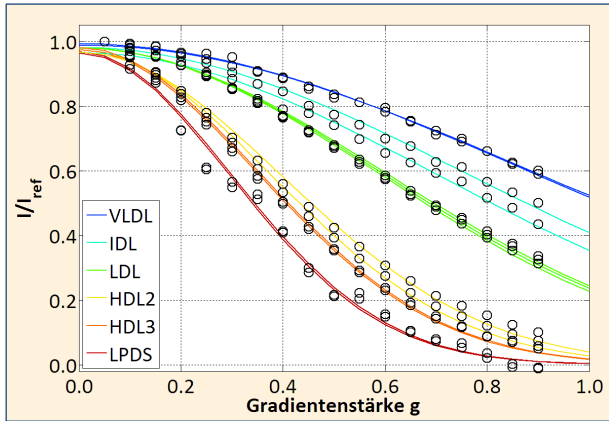


Abb. 4.21: Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der Lipoproteine und Serumproteine (LPDS) aus Abb. 4.20; aufgetragen wurden die Intensitäten der Signalmaxima im Bereich von 0.5-1.7 ppm (CH_3 - und CH_2 -Gruppen); verwendete Fitfunktion: $I(g) = I_0 (\exp(-c \cdot D \cdot g^2))$; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.4 und Abb. 4.20; die Diffusionskoeffizienten sind aufgrund der variierenden Spektrometerkonstanten nicht ganz korrekt, sind aber relativ zueinander konsistent und liefern eine gute Abschätzung (siehe Kapitel 3.3.4)

Berechnete Diffusionskoeffizienten

VLDL: CH_3 : $D = (1.01 \cdot 10^{-11} \pm 0.04 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH_2 : $D = (0.99 \cdot 10^{-11} \pm 0.03 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

IDL: CH_3 : $D = (1.56 \cdot 10^{-11} \pm 0.09 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH_2 : $D = (1.36 \cdot 10^{-11} \pm 0.06 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

LDL: CH_3 : $D = (2.28 \cdot 10^{-11} \pm 0.07 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH_2 : $D = (2.18 \cdot 10^{-11} \pm 0.07 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

HDL2: CH_3 : $D = (4.95 \cdot 10^{-11} \pm 0.26 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH_2 : $D = (5.55 \cdot 10^{-11} \pm 0.25 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

HDL3: CH_3 : $D = (6.21 \cdot 10^{-11} \pm 0.23 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH_2 : $D = (6.31 \cdot 10^{-11} \pm 0.25 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

LPDS: CH_3 : $D = (8.83 \cdot 10^{-11} \pm 0.80 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

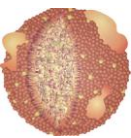
CH_2 : $D = (8.66 \cdot 10^{-11} \pm 0.79 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

Wie erwartet nahm der Diffusionskoeffizient und somit die Beweglichkeit zu kleineren Partikeln hin eindeutig zu. Der Unterschied zwischen den CH_3 - und CH_2 -Gruppen war relativ gering. Für die nachfolgende Berechnung wurde der entsprechende Mittelwert verwendet (Tab. 4.14).

Lipoproteinklasse	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3	LPDS
Diffusionskoeffizient [m^2/s]	$1.00 \cdot 10^{-11}$	$1.46 \cdot 10^{-11}$	$2.21 \cdot 10^{-11}$	$5.25 \cdot 10^{-11}$	$6.26 \cdot 10^{-11}$	$8.75 \cdot 10^{-11}$

Tab. 4.14: Gemittelte Diffusionskonstanten der Lipoproteine und Serumproteine (LPDS) aus Abb. 4.21

Die Diffusionsspektren des Serums (Abb. 4.20) wurden nun in MATLAB eingelesen und interpoliert, so dass 5000 äquidistante Punkte zwischen 0.5 und 5.5 ppm erhalten wurden. Die Signalhöhen für jede chemische Verschiebung wurden nach der Formel 4.1 gefittet (siehe Kapitel 3.3.4). Dabei wurde der Diffusionskoeffizient allerdings nicht als variabel angenommen, sondern die berechneten Diffusionskoeffizienten aus Tab. 4.14 als feste Werte vorgegeben. Außerdem wurde der Diffusionskoeffizient $1.00 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ hinzugefügt für den Fall, dass einige niedermolekulare Substanzen in der Lösung verblieben sind. Gefittet wurden also nur die Amplituden für jeden einzelnen Diffusionskoeffizienten. Die Summe aus allen Fitkurven musste schließlich wieder die Originalkurve ergeben. Der entsprechende MATLAB-Quellcode ist in Kapitel 7.3.4 angegeben.



$$I(g) = I_0 * e^{-D \gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) g^2} = I_0 * e^{-D c g^2}$$

4.1

I = Relative Intensität des Spektrums, I_0 = Intensität des ersten Spektrums, D = Diffusionskoeffizient, γ = Gyromagnetisches Verhältnis, δ = Gradientenlänge, Δ = Diffusionszeit, g = Gradientenstärke

So erhielt man für jede chemische Verschiebung eine relative Zusammensetzung der Lipoproteinklassen (Abb. 4.22 und Abb. 4.23).

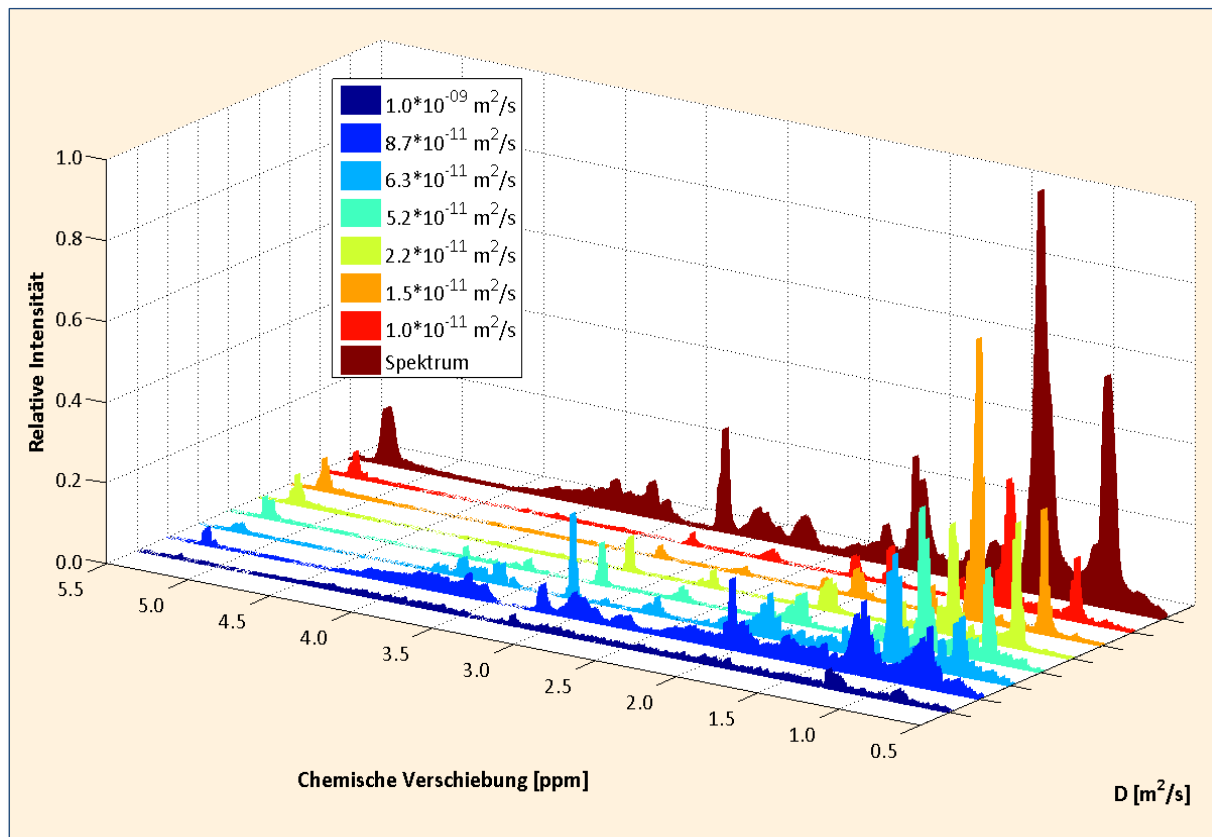


Abb. 4.22: Berechnete Anteile der Lipoproteinklassen in Serum: die Spektren der NMR-Diffusionsmessungen an Serum (Abb. 4.20) wurden zu 5000 äquidistanten chemischen Verschiebungen im Bereich von 0.5 bis 5.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; die jeweiligen Intensitäten wurden mit den Diffusionskonstanten (D) aus Tab. 4.14 und $1.00 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (für eventuelle niedermolekulare Substanzen) gegen die Gradientenstärke aufgetragen und so gefittet, dass der Anteil jedes Diffusionskoeffizienten variabel war und als Summe wieder im Originalsignal resultierten; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.4

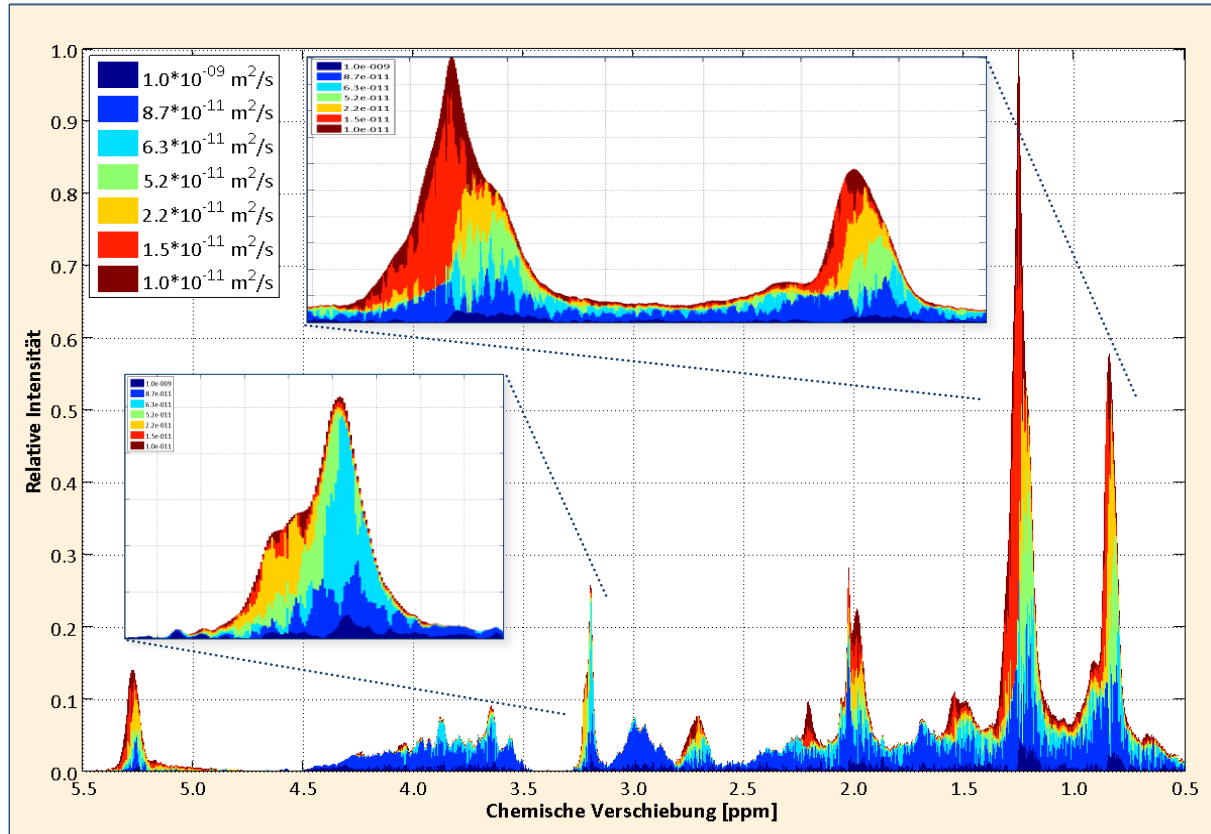


Abb. 4.23: Berechnete Anteile der Lipoproteinklassen in Serum (alternative Darstellung durch Addition aller Komponenten aus Abb. 4.22, Gesamtkurvenform entspricht dem Originalserum): die Spektren der NMR-Diffusionsmessungen an Serum (Abb. 4.20) wurden zu 5000 äquidistanten chemischen Verschiebungen im Bereich von 0.5 bis 5.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; die jeweiligen Intensitäten wurden mit den Diffusionskonstanten (D) aus Tab. 4.14 und $1.00 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (für eventuelle niedermolekulare Substanzen) gegen die Gradientenstärke aufgetragen und so gefittet, dass der Anteil jedes Diffusionskoeffizienten variabel war und als Summe wieder im Originalsignal resultierten; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.4

Erwartungsgemäß sind bei allen Signalen im tieffeldverschobenen Bereich die großen Partikel verstärkt vertreten, umgekehrt findet man hochfeldverschoben kleinere Partikel. VLDL (dunkelrot) ist besonders stark bei den Signalen vertreten, die aus den Fettsäuren resultieren, was aufgrund des hohen Triacylglycerid-Anteils sinnvoll ist. Hingegen findet man die Diffusionskoeffizienten, die dem HDL2 (grün) und HDL3 (hellblau) zuzuordnen sind, in hohem Maß im Bereich des Cholin-Kopfgruppensignals, was sehr gut mit den Ergebnissen der extrahierten Lipide korreliert (Kapitel 4.1.2.4, Tab. 4.7). Um 3.0 ppm und 4.0 ppm lässt sich die Diffusionskurve fast ausschließlich mit dem Diffusionskoeffizienten der Serumproteine fitten, was hervorragend mit den Originalspektren (Abb. 4.1) übereinstimmt.

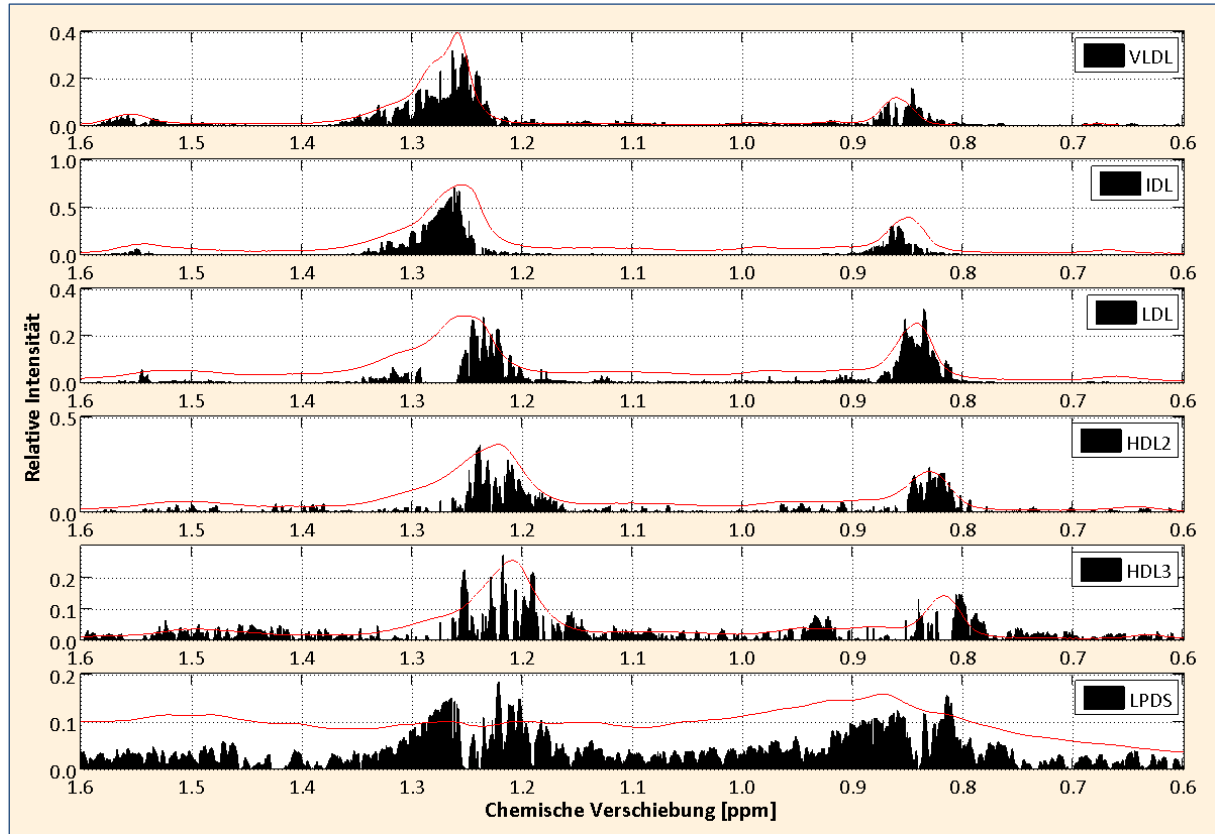
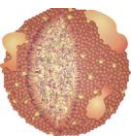


Abb. 4.24: Vergleich der berechneten Komponenten aus Abb. 4.22 und Abb. 4.23 (schwarz) mit den isolierten Lipoproteinen und Proteinen (LPDS) aus Abb. 4.4 (rot): zur besseren Übersicht wurden die Spektren der isolierten Lipoproteine und Proteine in ihrer Intensität den Komponenten angepasst

In Abb. 4.24 sind zum Vergleich alle berechneten Komponenten aus Abb. 4.22, beziehungsweise Abb. 4.23, zusammen mit den Spektren der isolierten Lipoproteine und Proteine abgebildet. Man sieht eine Verschiebung der Signalmaxima, die mit den Spektren der isolierten Proben korreliert.

Da nur die Diffusionskoeffizienten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen für die Fitfunktion berücksichtigt wurden, wurde die Gesamtverteilung der Lipoproteinklassen durch Addition aller Signalhöhen pro Diffusionskoeffizient im Bereich von 0.725 bis 1.45 ppm bestimmt (Tab. 4.15).

Lipoprotein-Klasse	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3	LDPS	Niedermolekulare Substanzen
D [m ² /s]	1.00*10 ⁻¹¹	1.46*10 ⁻¹¹	2.21*10 ⁻¹¹	5.25*10 ⁻¹¹	6.26*10 ⁻¹¹	8.75*10 ⁻¹¹	1.00*10 ⁻⁹
Summen aller Signalhöhen	20.28	35.31	20.10	22.63	19.55	34.72	7.54
Prozentuale Verteilung der Lipoprotein-Klassen	13.29%	23.14%	13.17%	14.83%	12.81%	22.75%	-
	17.21%	29.96%	17.05%	19.20%	16.59%	-	-
	-	-	32.27%	67.73%	-	-	-

Tab. 4.15: Verwendete Diffusionskoeffizienten (D) für die Fitfunktion (Tab. 4.14), berechnete Summen aller Signalhöhen im Bereich von 0.725 bis 1.450 ppm und prozentuale Verteilung bei unterschiedlicher Zusammenstellung der interessierenden Klassen aus Abb. 4.22 und Abb. 4.23; LDPS = Serumproteine; die Prozentangaben beziehen sich hierbei auf die Intensitätsverhältnisse der Spektren, dürfen aber nicht auf die entsprechende Anzahl der Partikel übertragen werden

4.1.5 KLINISCHE DATEN

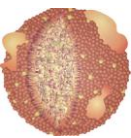
Das verwendete Serum wurde nach den gängigen Routineanalysen in einem klinischen Labor untersucht. Dabei wurden folgende Werte erhalten:

Messgröße	Bestimmter Wert [mg/dL]
Cholesterin	217
HDL-Cholesterin	48.8
LDL-Cholesterin	147
Triacylglyceride	103

Tab. 4.16: Cholesterin- und Triacylglycerid-Konzentrationen aus enzymatischer Analyse

4.1.6 ZUSAMMENFASSUNG

Von LDL ist bekannt, dass es näherungsweise 3000 Lipidmoleküle aufweist, HDL nur etwa 200¹³. Anhand der berechneten Lipidverteilung aus Kapitel 4.1.2.4 konnte eine ungefähre Anzahl der einzelnen Lipide pro LDL- oder HDL-Molekül berechnet werden (Tab. 4.17 und Tab. 4.18). Da die Lipide unterschiedliche molare Massen aufweisen, wurden die Werte entsprechend korrigiert. Als exemplarische Fettsäure für die Massenbestimmung wurde immer Linolsäure (18:2) verwendet, da diese relativ häufig vorkommt und einen guten Mittelwert darstellt.



LDL	Prozentuale Verteilung der Lipidmoleküle	Anzahl der Lipidmoleküle pro Partikel	Mittlere Molare Masse [g/mol]	Molare Masse aller Lipidmoleküle aus LDL [g/mol]
Cholesterin	18.64%	559	387	216170
Cholesterinester	48.44%	1453	649	943290
Sphingolipide	5.99%	180	727	130551
Phosphoglyceride	21.98%	659	782	515715
Triacylglyceride	4.14%	25	879	19025
Plasmalogene	0.82%	124	770	109118
Summe	100.0%	3000		1933869

Tab. 4.17: Berechnung der durchschnittlichen Anzahl der Lipidmoleküle pro LDL-Partikel; die prozentualen Verteilungen der Lipidmoleküle stammen aus Tab. 4.7; die molare Masse der Lipidgruppen wurde exemplarisch immer mit Linolsäure (18:2) berechnet

HDL2 und HDL3 wurden zu Gesamt-HDL zusammengefasst und die Werte entsprechend gemittelt.

HDL	Prozentuale Verteilung der Lipidmoleküle in HDL2	Prozentuale Verteilung der Lipidmoleküle in HDL3	Mittlere prozentuale Anteile	Anzahl der Lipidmoleküle pro Partikel	Mittlere Molare Masse [g/mol]	Molare Masse aller Lipidmoleküle aus HDL [g/mol]
Cholesterin	14.43%	7.02%	10.72%	21	387	8292
Cholesterinester	40.08%	39.34%	39.71%	79	649	51549
Sphingolipide	5.88%	7.97%	6.93%	14	727	10071
Phosphoglyceride	33.79%	38.35%	36.07%	72	782	56424
Triacylglyceride	3.52%	4.91%	4.22%	5	879	3631
Plasmalogene	2.30%	2.41%	2.36%	8	770	7414
Summe	100.00%	100.00%	100.00%	200		137381

Tab. 4.18: Berechnung der durchschnittlichen Anzahl der Lipidmoleküle pro HDL-Partikel; die prozentualen Verteilungen der Lipidmoleküle stammen aus Tab. 4.7 und werden als Mittelwert aus HDL2 und HDL3 bestimmt; die molare Masse der Lipidgruppen wurde exemplarisch immer mit Linolsäure (18:2) berechnet

Durch Multiplikation der berechneten molaren Massen mit der ausgezählten Anzahl der Partikel aus Kapitel 4.1.3 konnte ein direkter Vergleich zu den Lipiden hergestellt werden, die zu einem spektroskopischen Signal beitragen (Tab. 4.19).

Lipoproteinklasse	LDL	HDL
Molare Masse aller Lipidmoleküle pro Molekül aus Tab. 4.17 und Tab. 4.18 [g/mol]	1933869	137381
Anzahl aller Partikel aus Tab. 4.13	25.8	336.8
Resultierende Masse der Lipidmoleküle in allen Partikeln [g/mol]	49635974	44877711
Verhältnis LDL/HDL	53%	47%

Tab. 4.19: Zusammenfassung der obigen Tabellen und Berechnung der Gesamtmasse der Lipide in LDL- und HDL-Partikeln und das entsprechende molare Verhältnis

Aus den so berechneten Daten folgt, dass in gesamtem Serum ca. 53% der Lipide aus LDL stammen und ca. 47% aus HDL, natürlich unter Vernachlässigung der größeren Partikel.

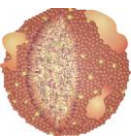
Im Vergleich dazu wurden die Daten der Komponentenanalyse aus Kapitel 4.1.1 betrachtet, bei der ein NMR-Spektrum von Serum aus den tatsächlich separierten und ebenso gemessenen Fraktionen wieder zusammengesetzt wurde (Tab. 4.20).

Lipoproteinklasse	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3	LPDS1	LPDS2
Prozentuale Verteilung der Lipoproteinklassen	7.18%	1.53%	11.96%	9.55%	5.64%	57.58%	6.73%
	20.03%	4.28%	33.35%	26.62%	15.73%	-	-
Verhältnis LDL/HDL	-		44.06%	55.94%		-	-
Sichtbarkeit der Lipide	-		ca. 75%	ca. 60%		-	-
Korrigiertes Verhältnis	-		39%	61%		-	-

Tab. 4.20: Zusammenfassung der Komponentenberechnung aus Tab. 4.2, korrigiert mit der Sichtbarkeit der Signale aus Tab. 4.9 bei 310 K: LPDS = Serumproteine; die Prozentangaben beziehen sich hierbei auf die Intensitätsverhältnisse der Spektren, dürfen aber nicht auf die entsprechende Anzahl der Partikel übertragen werden

Betrachtet man auch hier nur LDL und Gesamt-HDL, findet man ein Verhältnis von 44% zu 56%. Allerdings muss man davon ausgehen, dass nicht alle Lipide in den wässrigen Spektren sichtbar sind, wie sich in Kapitel 4.1.2.5 gezeigt hat. Unter der Annahme, dass sich das restliche Spektrum ähnlich verhält wie die CH₂-Gruppe zwischen den Doppelbindungen, die für den Integralvergleich herangezogen wurde, wurden die Verhältnisse entsprechend korrigiert und man erhielt ein Verhältnis von 39% zu 61%.

Die aus Kapitel 4.1.4 erhaltenen Werte beziehen sich ebenso auf die Intensität der NMR-Spektren und nicht auf die molare Zusammensetzung und werden auch mit der entsprechenden Sichtbarkeit der Lipide korrigiert (Tab. 4.21).



Lipoproteinklasse	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3	LDPS
Prozentuale Verteilung der Lipoproteinklassen	13.29%	23.14%	13.17%	14.83%	12.81%	22.75%
	17.21%	29.96%	17.05%	19.20%	16.59%	
			32.27%	67.73%		
Sichtbarkeit der Lipide			ca. 75%	ca. 60%		
Verhältnis LDL/HDL			28%	72%		

Tab. 4.21: Prozentuale Verteilung der Lipoproteinklassen und der Serumproteine, die mit Hilfe von Diffusionsmessungen berechnet wurden, korrigiert mit der Sichtbarkeit der Signale aus Tab. 4.9 bei 310 K: LPDS = Serumproteine; die Prozentangaben beziehen sich hierbei auf die Intensitätsverhältnisse der Spektren, dürfen aber nicht auf die entsprechende Anzahl der Partikel übertragen werden

Die Ergebnisse weichen deutlich von den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.1 ab. Der Anteil der Serumproteine (LPDS) ist deutlich geringer. Allerdings wurden die chemischen Verschiebungen von 5.5 bis 10 ppm ausgespart, in dem die Serumproteine einen respektablen Signalbeitrag leisten (siehe Abb. 4.1). Diese sind somit nicht vergleichbar. Betrachtet man aber einzig die Anteile der Lipoproteine findet man, dass VLDL, HDL2 und HDL3 relativ gut übereinstimmen, nur IDL wurde zu Lasten von LDL in höheren Anteilen gefunden. Das verwendete Pulsprogramm ist T_1 - und T_2 -gewichtet und hat auf unterschiedliche funktionelle Gruppen im Molekül also unterschiedliche starke Einflüsse. Man könnte daher die Berechnung der Diffusionskoeffizienten noch deutlich effektiver machen, indem man nicht nur die Mittelwerte der CH_3 - und CH_2 -Gruppen als feste Diffusionskoeffizienten für das gesamte Spektrum verwendet, sondern für jede chemische Verschiebung die Diffusionskoeffizienten aller Komponenten separat berechnet und diese wiederum in die Berechnung des gesamten Serums einsetzt. Außerdem muss erwähnt werden, dass die Auswertung in Kapitel 4.1.1 auf einer ,noesygppr1d'-Pulssequenz basiert. Die Diffusionsmessungen hingegen wurden mit einer ,ledbpgppr2s'-Pulssequenz durchgeführt, die ebenfalls durch unterschiedliche Wichtungen der T_1 - und T_2 -Zeiten, aber auch durch zusätzliche Diffusionswichtung von dem ,noesygppr'-Experiment abweicht.

Im klinischen Labor wurden routinemäßig die Konzentration von gesamtem Cholesterin bestimmt, sowie die Cholesterinkonzentrationen in HDL und LDL (Tab. 4.29).

Messgröße	Bestimmter Wert [mg/dL]
Cholesterin	217
HDL-Cholesterin	48.8
LDL-Cholesterin	147
Triacylglyceride	103

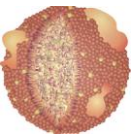
Tab. 4.22: Cholesterin- und Triacylglycerid-Konzentrationen aus Kapitel 4.1.5

Geht man von der Berechnung in Tab. 4.17 und Tab. 4.18 aus, besitzt ein durchschnittlicher LDL-Partikel 2012 Cholesterinmoleküle, ein HDL-Partikel dagegen nur 101. Um das entsprechende Konzentrationsverhältnis zu erhalten, würde man rein rechnerisch LDL zu 13% und HDL zu 87% erwarten (Tab. 4.23).

Lipoproteinklasse	LDL	HDL
Anzahl der Cholesterinmoleküle pro Partikel	2012	101
Molare Masse des Partikels [g/mol]	1933869	137381
Cholesterin-Konzentration [mg/dL]	147	48.8
Konzentration der Partikel [mg/dL]	0.073	0.483
Konzentration der Partikel [mol/L]	$3.778 \cdot 10^{-8}$	$3.517 \cdot 10^{-6}$
Verhältnis LDL/HDL	13%	87%

Tab. 4.23: Molare Verteilung und Gesamt-Konzentration von LDL und HDL in Serum auf Grund der Cholesterinkonzentration, die im klinischen Labor bestimmt wurde aus Tab. 4.16

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass jede Methode der Quantifizierung gewisse Unsicherheiten birgt, die die Ergebnisse beeinflussen. Die Auszählung anhand der Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wurde nur für eine kleine Stelle betrachtet und kann durch das Hintergrundrauschen nicht automatisiert werden. Würde man die Serumproteine allerdings vorher entfernen, könnte das einen Einfluss auf die Konzentration ausüben, der nicht abzusehen ist. Die Lipidanzahl pro Partikel wurde mit 3000 für LDL und 200 für HDL als sinnvolles Mittel angenommen, definiert aber nicht die tatsächliche Anzahl. Da diese aber für alle Partikel variiert, ist dieses Mittel eine gute Näherung. Dasselbe gilt für die Berechnung der molaren Massen der Lipide und die mittleren Diffusionskoeffizienten. Die Sichtbarkeit der Spektren konnte nur mit einem Signal sinnvoll bestimmt werden und lässt sich nicht ohne Weiteres auf andere Signale im Spektrum ausweiten, da diese durch Nachbarsignale überlagert werden und somit nicht quantitativ verglichen werden können.



4.2 STRUKTUREVALUATION DER LIPOPROTEINKLASSEN

Lipoproteine sind Partikel, deren Hülle durch eine einfache Membran aus Cholesterin, Phosphoglyceriden und Sphingolipiden aufgebaut ist (Abb. 4.25). Ihre hydrophilen Kopfgruppen zeigen systematisch nach außen, um den gesamten Partikel wasserlöslich zu machen. Im Inneren des befinden sich unpolare Moleküle wie Triacylglyceride und Cholesterinester, aber auch freies Cholesterin³⁰⁻³¹. Es wird zudem diskutiert, dass Cholesterinester und Triacylglyceride nach außen penetrieren und sich partiell in der Membran befinden können¹². Essentiell für die Struktur der Lipoproteine sind die Apolipoproteine, die entweder fest mit einem Partikel verbunden (ApoB100 und ApoB48) oder austauschbar sind zwischen verschiedenen Partikeln (ApoA, ApoC, ApoD und ApoE)^{3-4, 61-62}.

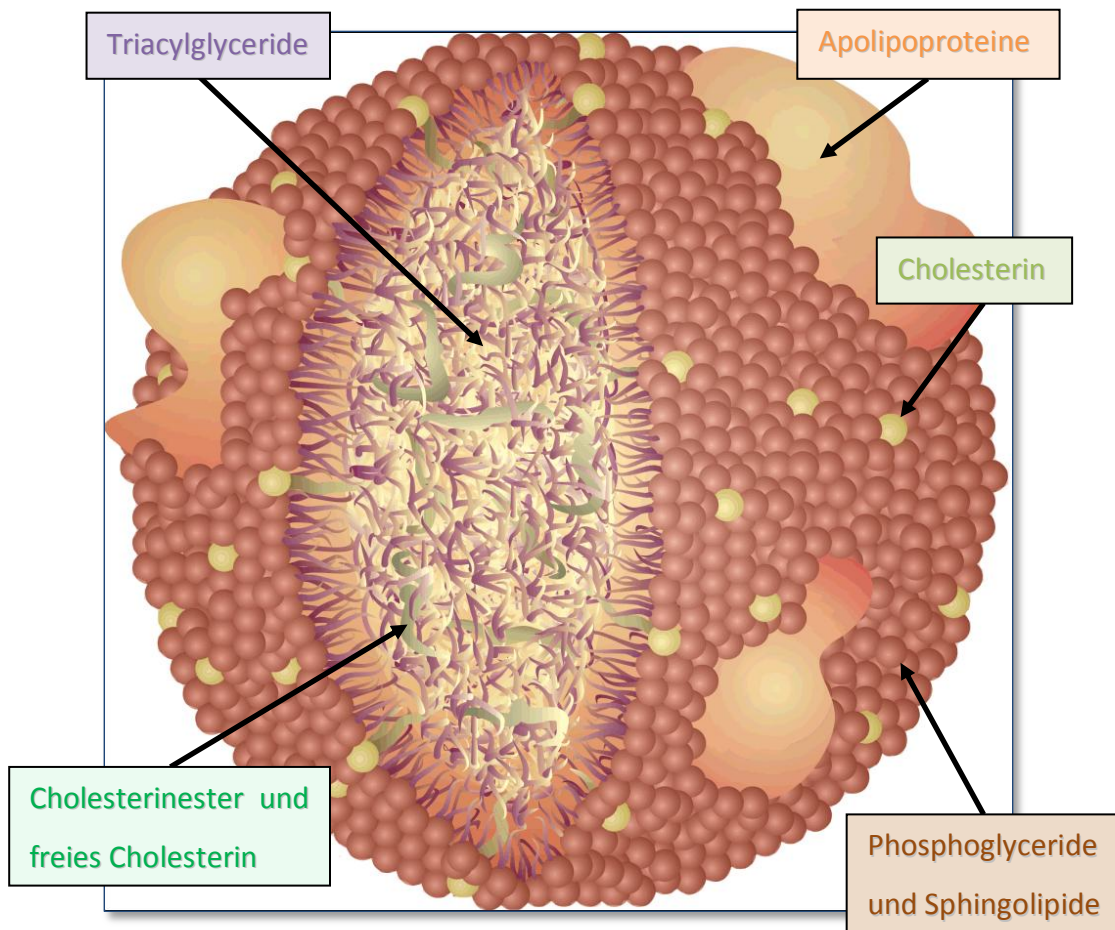


Abb. 4.25: Schematischer Aufbau der allgemeinen Lipoproteinstruktur: die Hülle des Partikels wird durch Cholesterin und Phosphoglyceride, beziehungsweise Sphingolipide aufgebaut, im Inneren befinden sich Triacylglyceride, Cholesterinester und freies Cholesterin; strukturgebendes Element sind die fest verankerten oder austauschbaren Apolipoproteine

Es wurden bereits vielfach Strukturanalysen verschiedener Lipoproteinpartikel mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Anhand der Signalintensitäten verschiedener funktioneller Gruppen bei unterschiedlichen Temperaturen konnte zum Beispiel ein Phasenübergang in LDL nachgewiesen werden⁶³, wobei sich diese Ergebnisse mit Messungen durch dynamische Differenzkalorimetrie deckten⁶⁴⁻⁶⁵. 1995 gelang es Ala-Korpela et al. zudem, durch die Ableitung temperaturabhängiger Signalintensitäten, bei LDL Strukturänderungen im Kern und an der Oberfläche zu detektieren, bei HDL dagegen nur an der Oberfläche⁶⁶. Mittels Bestimmung der T_1 - und T_2 -Relaxationszeit von ^{13}C -markiertem Cholesterin konnten weiterhin Erkenntnisse zur Cholesterinverteilung in HDL und LDL erzielt werden. Während sich in HDL das freie Cholesterin zu etwa 60% an der Oberfläche befindet und zu 40% im Partikelinneren⁶¹, liegt das Verhältnis bei LDL bei etwa 70% zu 30%⁶². Der Austausch der Cholesterinmoleküle war hierbei in HDL deutlich schneller als in LDL. Die Untersuchung von T_2 -Relaxationszeiten führte auch zu Ergebnissen im Bereich der Cholin-Signale, da für Phosphatidylcholin und Sphingomyelin unterschiedliche Beweglichkeiten gefunden wurden⁶⁷.

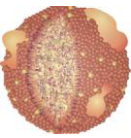
Die T_2 -Relaxationszeit hat direkten Einfluss auf die Linienbreite im NMR-Signal (Formel 4.2.). Die beobachtete Linienbreite ist jedoch meist inhomogen und setzt sich auch mehreren Linienbreiten zusammen, die eine dispergierende chemische Verschiebung aufweisen.

$$\Delta \nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2}$$

4.2

$\Delta \nu_{1/2}$ = Volle Linienbreite in Hz, T_2 = Transversale Relaxationszeit

Für einen starren Körper nimmt die T_2 -Relaxationsrate ($1/T_2$) durch die Rotationsdiffusion bei größerem Volumen (hydrodynamischen Radius) oder geringerer Temperatur zu und kann durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben werden. Findet jedoch innerhalb einer übergeordneten Molekülstruktur interne Bewegung oder Diffusion statt, kann man das komplexe System durch eine Kombination beider Faktoren nach dem modelfreien Ansatz von Lipari-Szabo beschreiben^{28, 68-69}. Durch erhöhte innere Beweglichkeit, welche auch durch die Temperatur aktiviert werden kann, wird so die T_2 -Rate verringert, beziehungsweise die T_2 -Zeit erhöht. Findet keine nennenswerte interne



Bewegung statt, wird eine Detektion durch starke Linienverbreiterung praktisch unmöglich. Dies ist bei Phasenübergängen unterhalb der Umwandlungstemperatur der Fall⁷⁰.

Für anschließende Betrachtungen werden folgende Zusammenhänge wichtig sein:

- Die T_2 -Zeit steigt mit höherer Temperatur, mit höherer Beweglichkeit der Protonen und mit dem Abstand der betrachteten wechselwirkenden Kernspins
- Für den Spezialfall, dass keine interne Beweglichkeit in einem Molekül stattfindet und das Molekül als kugelförmig angenommen werden kann, sinkt die T_2 -Zeit mit höherer Partikelgröße
- Für steigende T_2 -Zeiten sinkt die Linienbreite des NMR-Signals oder anders ausgedrückt, die Linienbreite sinkt mit höherer Beweglichkeit

4.2.1 TEMPERATURABHÄNGIGE NMR-SPEKTROSKOPIE AN SERUM UND LIPOPROTEINEN

Strukturelle Betrachtungen von Serum mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen gestalten sich durch die Überlagerung der verschiedenen Partikel und Proteine äußerst schwierig⁷¹⁻⁷². Um das Temperaturverhalten von gesamtem Serum zu studieren, wurden somit vorab VLDL, LDL und HDL2 als Hauptvertreter separat untersucht. Dazu wurden jeweils temperaturabhängige NMR-Spektren aufgenommen und T_2 -Relaxationszeit-Messungen durchgeführt. Es wurden dieselben Proben wie in Kapitel 4.1 verwendet. Eine detaillierte Zuordnung der Signale in wässrigen Proben ist in Kapitel 4.1, Abb. 4.2 und Abb. 4.3, zu finden. Zum Vergleich der Signale aller Einzellipide in extrahierten Proben, siehe Kapitel 4.1.2, insbesondere Abb. 4.6 und Abb. 4.10.

In Abb. 4.26 ist die Temperaturabhängigkeit von VLDL zu sehen. Die zugehörigen chemischen Verschiebungen der Signalmaxima befinden sich in Tab. 4.24.

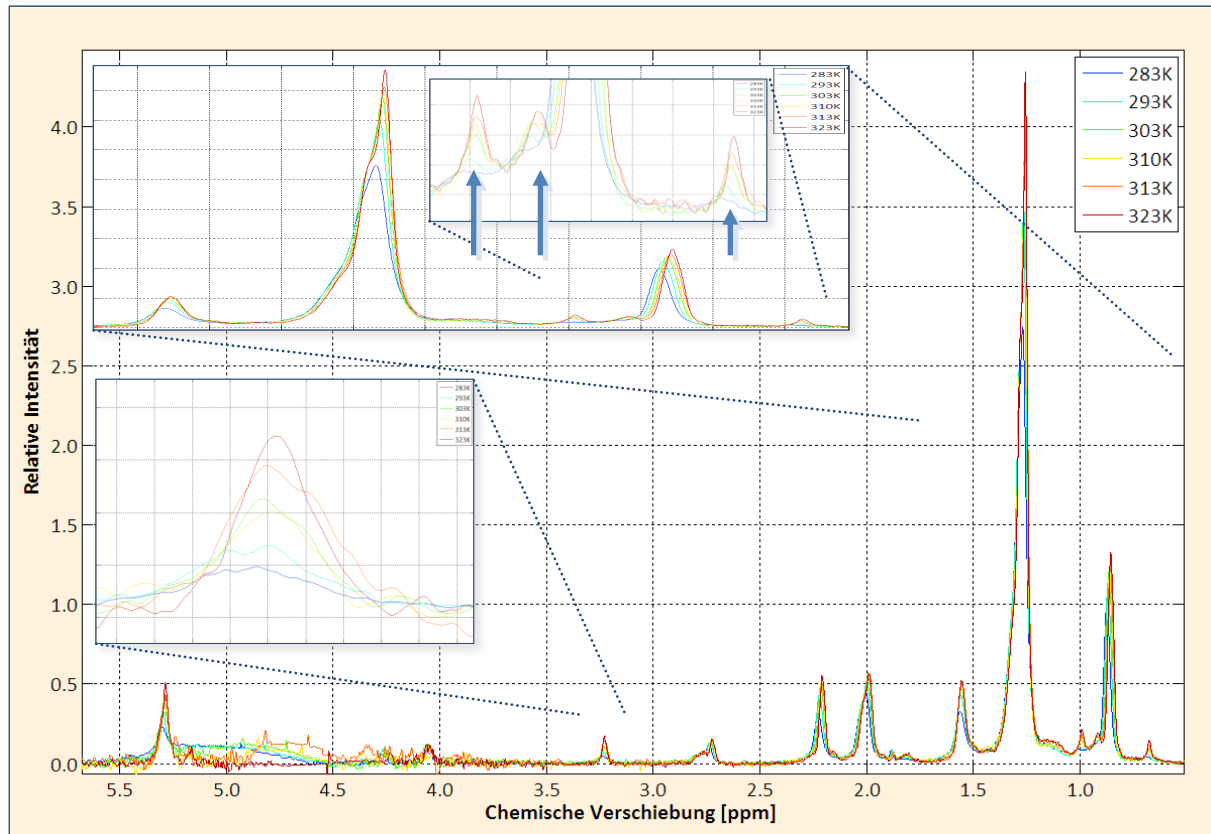
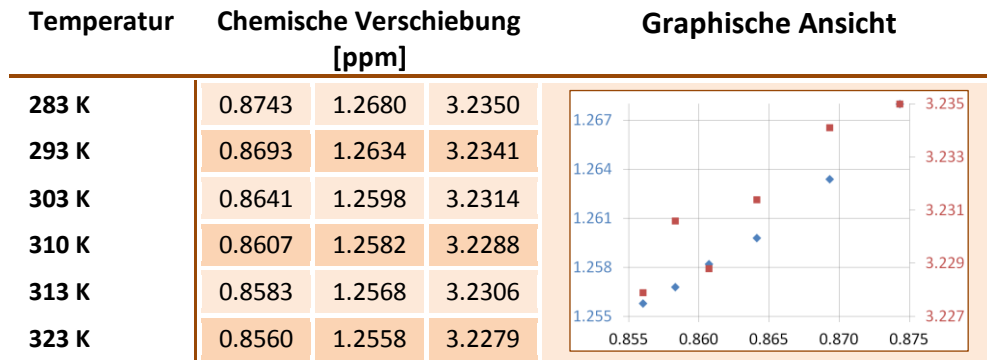
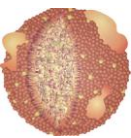


Abb. 4.26: Temperaturabhängige NMR-Spektren von VLDL: die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); die Signalhöhe des CH_3 -Peakmaximums (0.8 - 0.9 ppm) der niedrigsten Temperatur wurde auf 1.0 normiert; die blauen Pfeile markieren den Anstieg signifikanter Cholesterinsignale

Man kann einen kontinuierlichen Signalanstieg mit einer höheren Temperatur erkennen (siehe Abb. 4.37). Außerdem findet man eine Hochfeldverschiebung für alle funktionellen Moleküle. VLDL ist im Wesentlichen frei von Protein-Untergrundsignalen, da der Proteingehalt hier sehr gering ist. Bei niedrigen Temperaturen sind manche Signale, insbesondere Cholesterin-Signale, fast gänzlich verschwunden. Dies ist auf die geringere Beweglichkeit und somit auf eine Signalverbreiterung zurückzuführen.



Tab. 4.24: Maxima der NMR-Signale der Cholin-Gruppe bei 3.2 ppm, der CH₂-Gruppe bei 1.2 ppm und der CH₃-Gruppe bei 0.8 ppm aus Abb. 4.26; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH₂-Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH₃-Gruppen aufgetragen

Detailliertere Aussagen über die Beweglichkeit einzelner Molekülgruppen kann man mit Hilfe von T₂-Relaxationszeiten machen. In Abb. 4.27 sind die entsprechenden NMR-Spektren und die daraus berechneten T₂-Zeiten einiger Signale exemplarisch bei 310 K dargestellt.

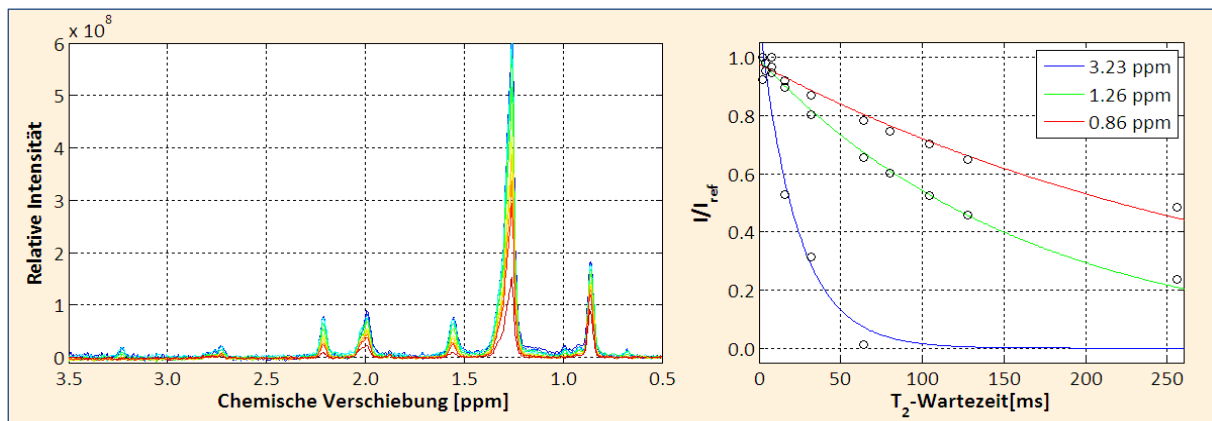


Abb. 4.27: Bestimmung der T₂-Zeiten ausgewählter Signale in VLDL: gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz cpmgpr und einer Echozeit von 0.5 ms bei 310 K; 500 µL Probe enthielten 100 µM DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); links: Gemessene Einzelspektren mit variabler Wartezeit von 2 ms (blau) bis 256 ms (rot); rechts: Kurvenverlauf der Intensitäten im Signalmaximum ausgewählter chemischer Verschiebungen, verwendete Fitfunktion: $I(t) = I_0 \exp(-t/T_2)$

Berechnete T₂-Zeiten von VLDL

Cholin: 3.23 ppm: T₂ = (23.15 ± 11.73) ms

CH₂: 1.26 ppm: T₂ = (164.04 ± 9.93) ms

CH₃: 0.86 ppm: T₂ = (327.18 ± 39.14) ms

Während die T₂-Zeit der Methylgruppen zu 327 ms berechnet wurde, findet man für die Methylengruppe lediglich eine T₂-Zeit von 164 ms, also etwa halb so groß. Im Gegensatz dazu wurde für die Cholin-Kopfgruppe lediglich eine T₂-Zeit von 23 ms gefunden, was aber auch an der geringen

Signalintensität und dem entsprechend großen Fehler liegt. Daher wird dieses Signal im Folgenden nicht weiter betrachtet.

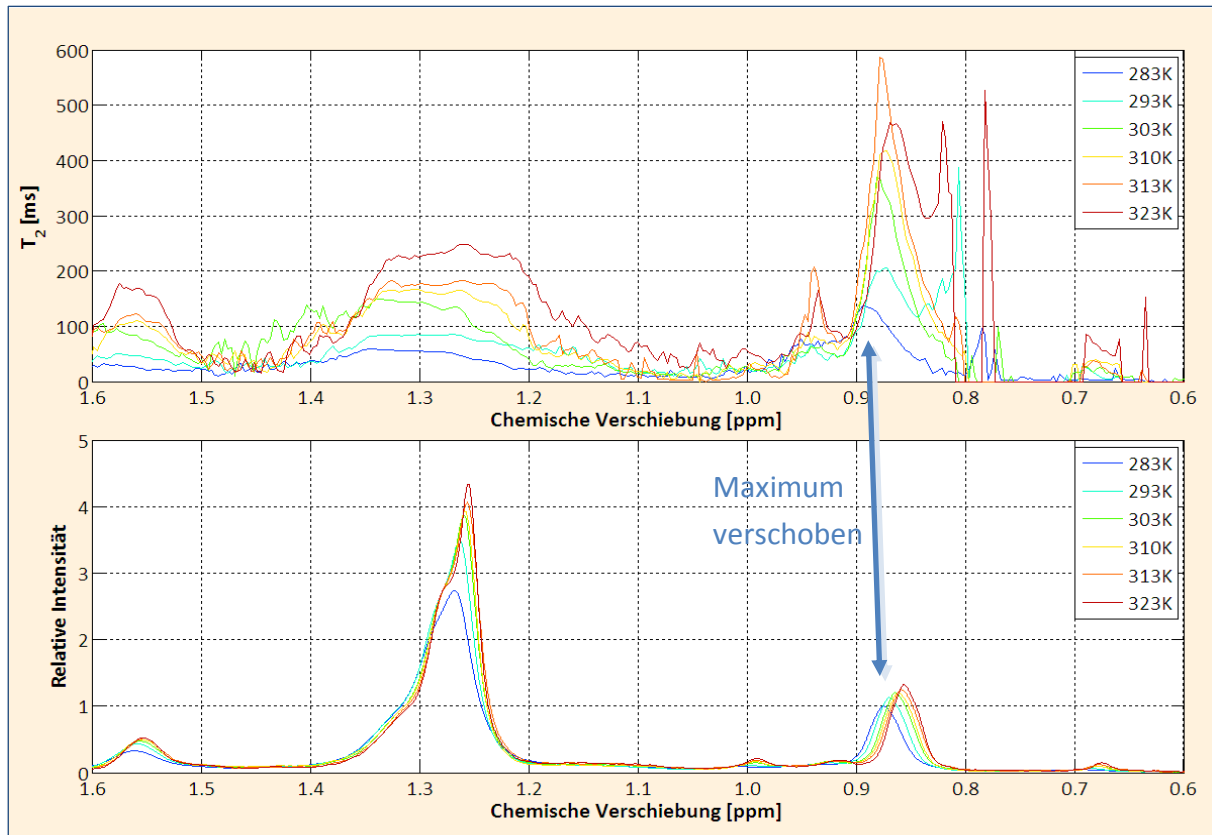
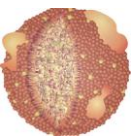


Abb. 4.28: Berechnete T_2 -Zeiten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen in VLDL (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d gemessen (Abb. 4.26); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz cpmgpr und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (Abb. 4.27); die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zu Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben)

In Abb. 4.28 wurden die berechneten T_2 -Zeiten im Bereich von 0.6 - 1.6 ppm gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben) und mit den Originalspektren (unten) verglichen. Zur Berechnung wurden die Spektren in MATLAB eingelesen und für jede chemische Verschiebung eine Fitkurve wie in Abb. 4.27 erzeugt. Der MATLAB-Quellcode dazu befindet sich in Kapitel 7.3.5. Durch diese Auftragung kann man noch besser erkennen, dass die Methylgruppe einen höheren Zuwachs an Beweglichkeit erfährt als die Methylengruppe.



Trotz etwa fünffacher Erhöhung der T_2 -Zeiten kann man allerdings keine signifikante Verschmälerung der Linien beobachten. Einzig das CH_2 -Gruppen-Signal scheint zu höheren Temperaturen hin aufzuspalten. Da die breiten Linien durch die Überlagerung sehr vieler Frequenzen zustande kommen, war diese Beobachtung zu erwarten. Auffällig ist die Tatsache, dass sich die T_2 -Zeiten der Methylengruppe über den gesamten Signalbereich nahezu identisch verhalten, die der Methylgruppe allerdings ein Maximum zeigen, das im Verhältnis zum Originalspektrum zu höheren Frequenzen hin verschoben ist.

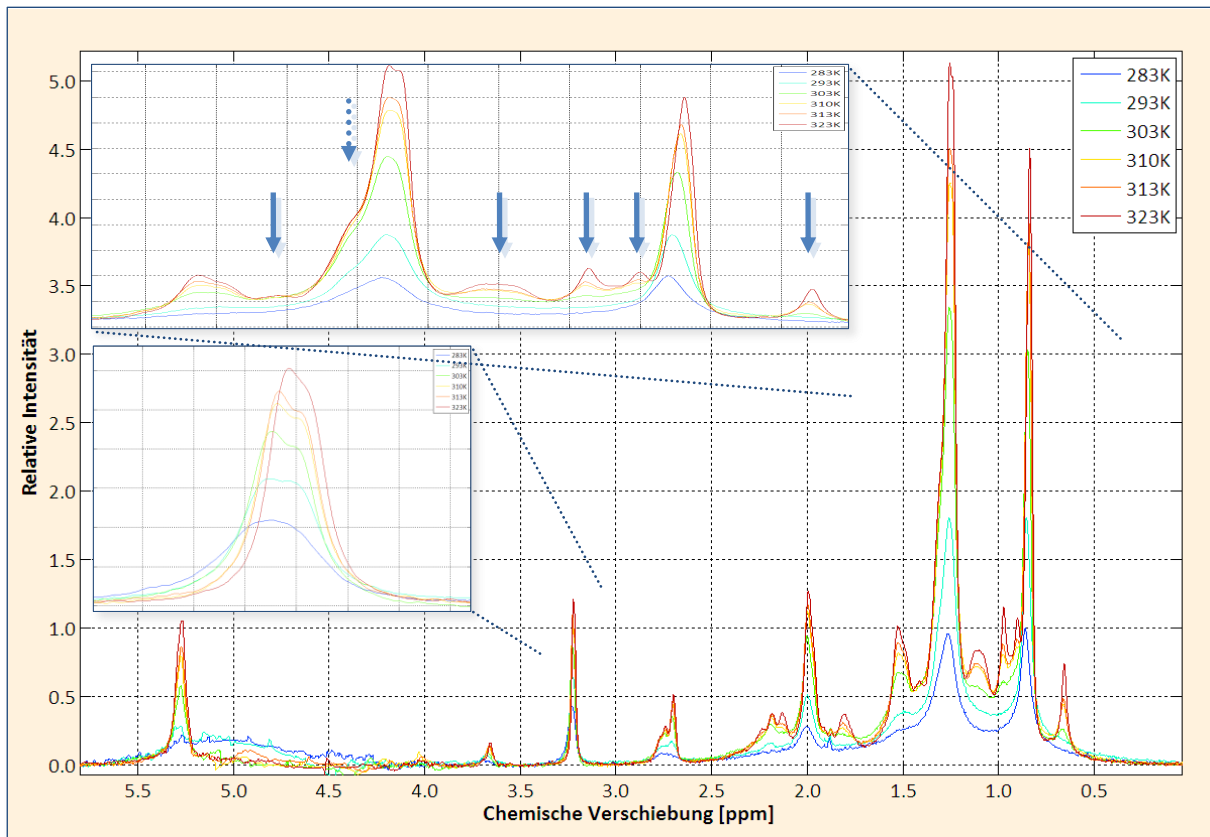
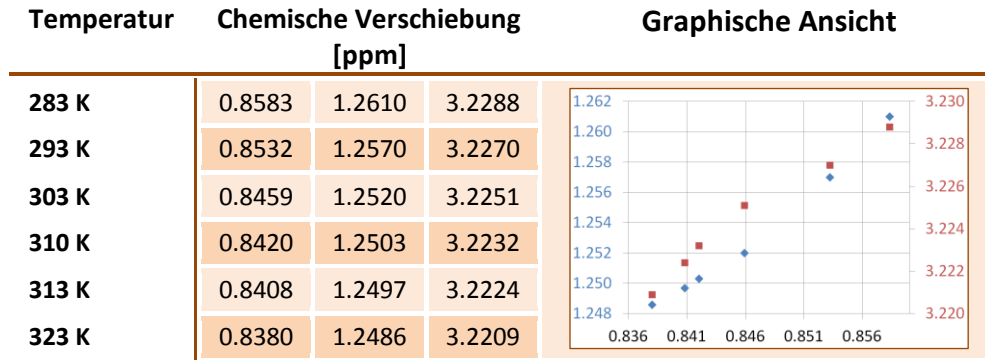


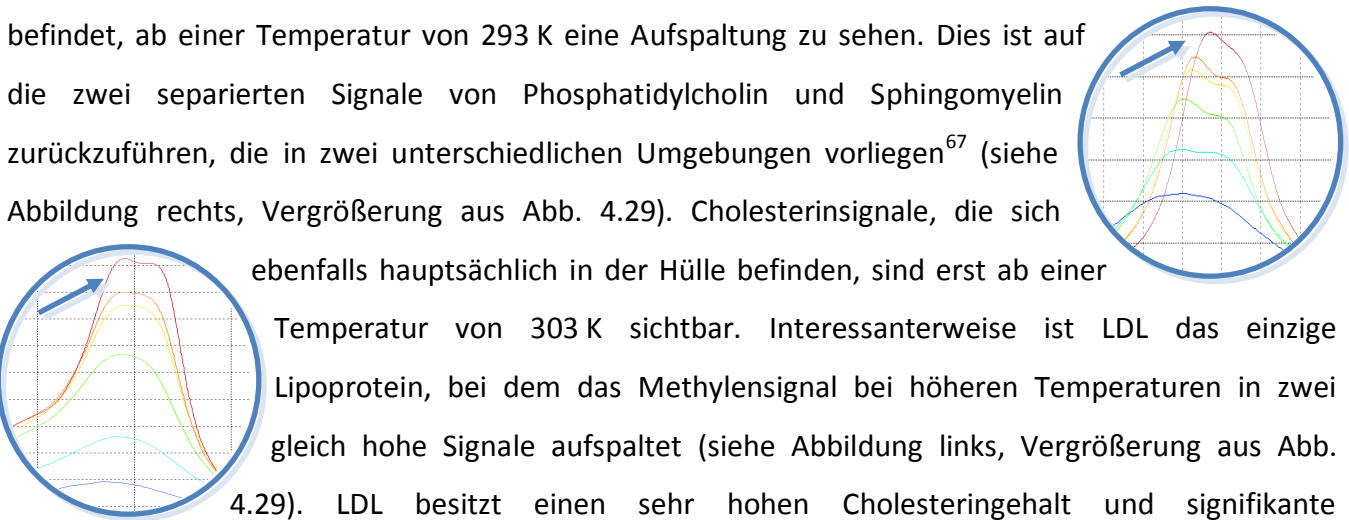
Abb. 4.29: Temperaturabhängige NMR-Spektren von LDL: die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); die Signalhöhe des CH_3 -Peakmaximums (0.8 - 0.9 ppm) der niedrigsten Temperatur wurde auf 1.0 normiert; die blauen Pfeile markieren den Anstieg signifikanter Cholesterinsignale

Dieselben Betrachtungen wurden nun auch für LDL durchgeführt. In Abb. 4.29 befinden sich die temperaturabhängigen NMR-Spektren, in Tab. 4.25 die zugehörigen chemischen Verschiebungen.

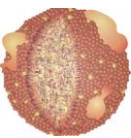


Tab. 4.25: Maxima der NMR-Signale der Cholin-Gruppe bei 3.2 ppm, der CH₂-Gruppe bei 1.2 ppm und der CH₃-Gruppe bei 0.8 ppm aus Abb. 4.29; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH₂-Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH₃-Gruppen aufgetragen

Man kann einen Signalanstieg sehen, der sogar noch deutlicher ausgeprägt ist als bei VLDL (siehe Abb. 4.37). Auch eine Verschiebung zu höheren Feldern ist zu sehen. Parks et al. haben dieses Verhalten eingehend studiert⁷³. LDL weist bei zwei Temperaturen bekannte Strukturumwandlungen auf, zum einen im Inneren des Partikels bei knapp unter 303 K, zum anderen in der Membran bei etwa 293 K⁶⁶. In den NMR-Spektren ist im Bereich der Cholin-Kopfgruppe, die sich ausschließlich in der Membran befindet, ab einer Temperatur von 293 K eine Aufspaltung zu sehen. Dies ist auf die zwei separierten Signale von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin zurückzuführen, die in zwei unterschiedlichen Umgebungen vorliegen⁶⁷ (siehe Abbildung rechts, Vergrößerung aus Abb. 4.29). Cholesterinsignale, die sich ebenfalls hauptsächlich in der Hülle befinden, sind erst ab einer Temperatur von 303 K sichtbar. Interessanterweise ist LDL das einzige Lipoprotein, bei dem das Methylensignal bei höheren Temperaturen in zwei gleich hohe Signale aufspaltet (siehe Abbildung links, Vergrößerung aus Abb. 4.29). LDL besitzt einen sehr hohen Cholesteringehalt und signifikante Cholesterinsignale befinden sich unter anderem an eben dieser Position. Dies lässt vermuten, dass der tieffeld-verschobene Signalbeitrag des CH₂-Gruppen-Signals auf Cholesterin zurückzuführen ist.



Auch für LDL wurden T₂-Relaxationszeiten bei 310 K bestimmt (Abb. 4.30, Abb. 4.31 und Abb. 4.32). Im Gegensatz zu VLDL waren hier die T₂-Zeiten der CH₃- und Cholin-Kopfgruppe mit 69 ms und 58 ms relativ ähnlich. Die T₂-Zeit der CH₂-Gruppe betrug nur 41 ms. Die CH₃-Gruppe wies somit die höchste Beweglichkeit auf, gefolgt von der Cholin-Kopfgruppe und die geringste Beweglichkeit war bei der



CH₂-Gruppe zu finden. Insgesamt waren die T₂-Zeiten fast um einen Faktor fünf kleiner als die, die in VLDL berechnet wurden, was auf die allgemein geringere Beweglichkeit der einzelnen Lipide zurückzuführen ist. Die Annahme, dass Lipoproteine starre Partikel ohne interne Beweglichkeit sind, würde in diesem Fall zu einer höheren T₂-Zeit führen, was ganz offensichtlich nicht der Fall ist.

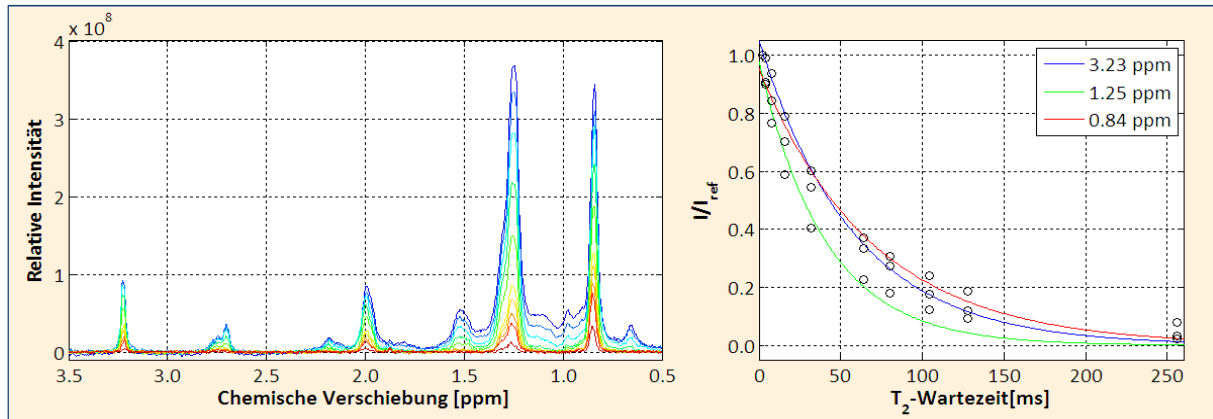


Abb. 4.30: Bestimmung der T₂-Zeiten ausgewählter Signale in LDL: gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *cpmgpr* und einer Echozeit von 0.5 ms bei 310 K; 500 µL Probe enthielten 100 µM DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); **links:** Gemessene Einzelspektren mit variabler Wartezeit von 2 ms (blau) bis 256 ms (rot); **rechts:** Kurvenverlauf der Intensitäten im Signalmaximum ausgewählter chemischer Verschiebungen, verwendete Fitfunktion: $I(t) = I_0 \exp(-t/T_2)$

Berechnete T₂-Zeiten von LDL

- Cholin :** 3.23 ppm: T₂ = (57.93 ± 2.89) ms
CH₂: 1.25 ppm: T₂ = (40.70 ± 8.82) ms
CH₃: 0.84 ppm: T₂ = (69.20 ± 11.91) ms

In Abb. 4.31 und Abb. 4.32 sind wiederum die T₂-Zeiten in Abhängigkeit der chemischen Verschiebung angegeben. Das Verhalten ist dem von VLDL sehr ähnlich. Auch hier kann man einen signifikanten Anstieg der von T₂ und somit auch der Beweglichkeit erkennen. Allerdings sind die T₂-Werte bei 283 K noch um ein Vielfaches geringer. Der Grund liegt hier in der dichten Packung der Lipide in LDL. Das Maximum der T₂-Werte der Methylgruppen im Vergleich zu den Originalspektren ist ebenfalls tieffeldverschoben.

Die T₂-Relaxationszeiten der Cholesterinsignale ändern sich kaum. Ihr Wert bleibt mit 10 - 20 ms konstant sehr niedrig. Cholesterin ist also im Allgemeinen sehr unbeweglich in dem Partikel eingebunden. Allerdings muss auch die starre Grundstruktur des Cholesterinmoleküls berücksichtigt werden, die die Bewegung an sich zusätzlich einschränkt (siehe Abb. 4.12).

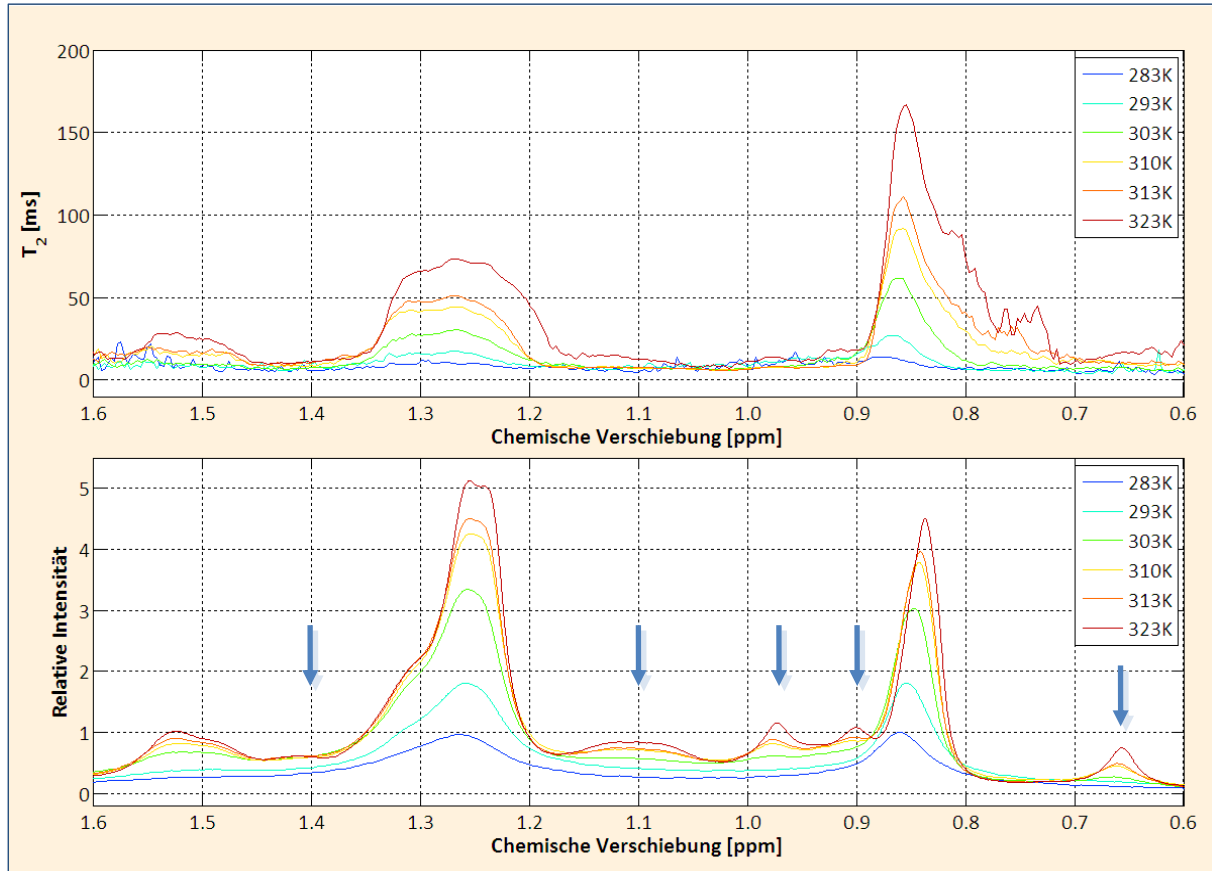


Abb. 4.31: Berechnete T_2 -Zeiten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen in LDL (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `noesygppr1d` gemessen (Abb. 4.29); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `cpmgpr` und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (Abb. 4.30); die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zu Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben); die blauen Pfeile markieren signifikante Cholesterinsignale

Die T_2 -Zeiten der Cholin-Kopfgruppen-Signale steigt stetig an und zeigt über den gesamten Signalbereich keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 4.32).

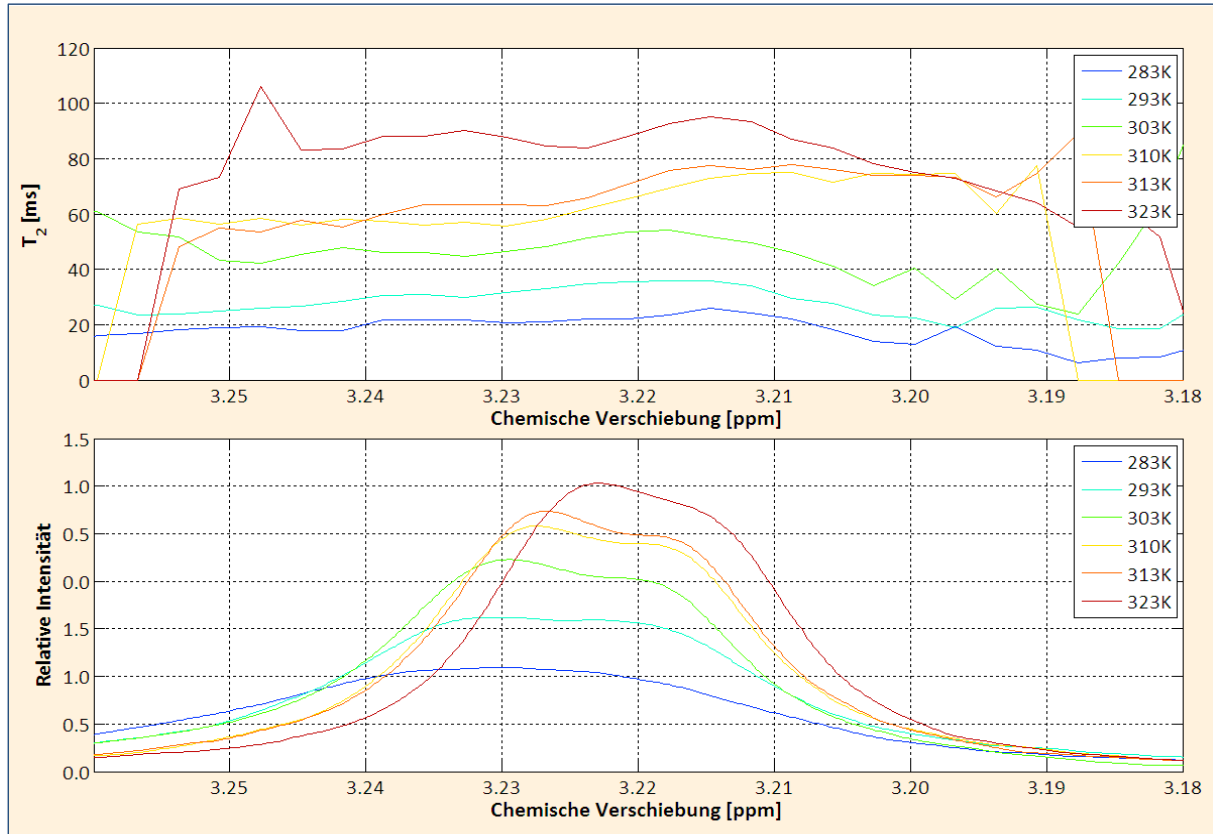
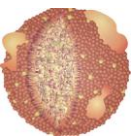


Abb. 4.32: Berechnete T_2 -Zeiten der Cholin-Kopfgruppe in LDL (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `noesygppr1d` gemessen (Abb. 4.29); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `cpmgpr` und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (Abb. 4.30); die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zu Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben)

Zuletzt wurde HDL2 untersucht. In Abb. 4.33 sind die temperaturabhängigen NMR-Spektren dargestellt und in Tab. 4.26 die chemischen Verschiebungen der Signalmaxima zusammengestellt.

Wie bei VLDL und LDL sieht man auch hier einen Signalanstieg bei Erhöhung der Temperatur (siehe Abb. 4.37) und eine Verschiebung zu höheren Feldern. Ähnlich wie in LDL sind auch hier die Cholesterinsignale erst ab einer Temperatur von 303 K deutlich zu erkennen.

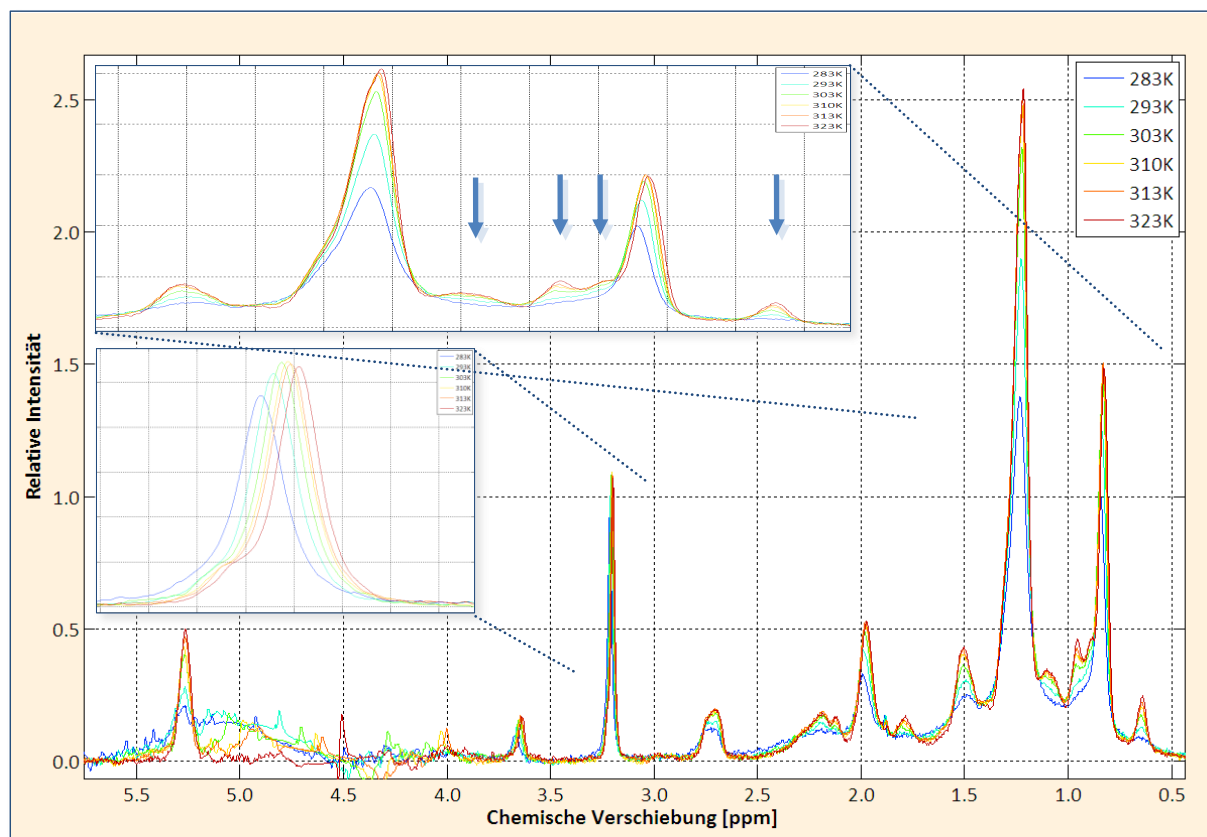
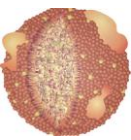


Abb. 4.33: Temperaturabhängige NMR-Spektren von HDL2: die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygp1d; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); die Signalhöhe des CH_3 -Peakmaximums (0.8 - 0.9 ppm) der niedrigsten Temperatur wurde auf 1.0 normiert; die blauen Pfeile markieren den Anstieg signifikanter Cholesterinsignale

Temperatur	Chemische Verschiebung [ppm]			Graphische Ansicht
283 K	0.8418	1.2299	3.2134	
293 K	0.8356	1.2255	3.2084	
303 K	0.8331	1.2231	3.2053	
310 K	0.8291	1.2191	3.2005	
313 K	0.8303	1.2194	3.2012	
323 K	0.8273	1.2164	3.1987	

Tab. 4.26: Maxima der NMR-Signale der Cholin-Gruppe bei 3.2 ppm, der CH_2 -Gruppe bei 1.2 ppm und der CH_3 -Gruppe bei 0.8 ppm aus Abb. 4.33; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH_3 -Gruppen aufgetragen

Die Berechnung der T_2 -Relaxationszeiten bei 310 K lieferte als Ergebnis, dass die Cholin-Kopfgruppen mit einer T_2 -Zeit von 187 ms die höchste Beweglichkeit aufweisen, gefolgt von den CH_3 -Gruppen mit



129 ms und den CH₂-Gruppen mit 55 ms. Insgesamt wurden Werte erhalten, die zwischen denen von VLDL und LDL lagen.

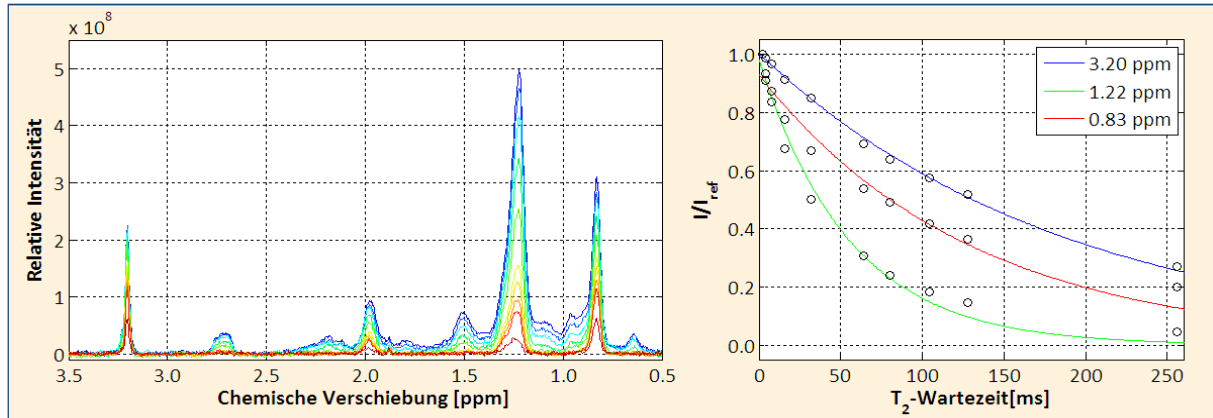


Abb. 4.34: Bestimmung der T_2 -Zeiten ausgewählter Signale in HDL2: gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz cpmgpr und einer Echozeit von 0.5 ms bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); **links:** Gemessene Einzelspektren mit variabler Wartezeit von 2 ms (blau) bis 256 ms (rot); **rechts:** Kurvenverlauf der Intensitäten im Signalmaximum ausgewählter chemischer Verschiebungen, verwendete Fitfunktion: $I(t) = I_0 \exp(-t/T_2)$

Berechnete T_2 -Zeiten von HDL2

Cholin : 3.20 ppm: $T_2 = (187.46 \pm 9.87)$ ms

CH₂: 1.22 ppm: $T_2 = (55.13 \pm 8.91)$ ms

CH₃: 0.83 ppm: $T_2 = (129.01 \pm 33.80)$ ms

Auch hier fand man wieder eine Verschiebung der T_2 -Maxima der Methylgruppen im Verhältnis zu den Originalspektren.

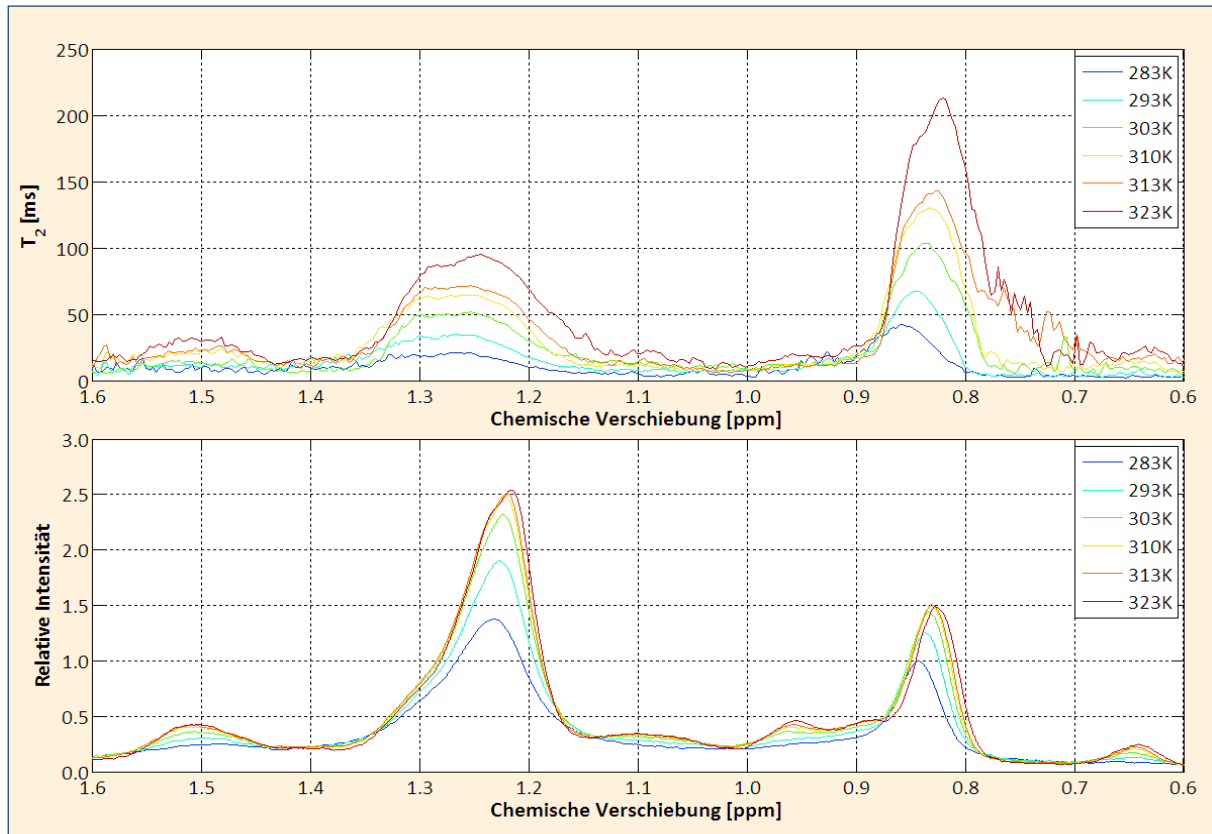


Abb. 4.35: Berechnete T_2 -Zeiten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen in HDL2 (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `noesygppr1d` gemessen (Abb. 4.33); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `cpmgpr` und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (Abb. 4.34); die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zu Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben)

Die Cholin-Kopfgruppe verhält sich sehr ähnlich wie in LDL und nimmt in ihrer Beweglichkeit relativ einheitlich zu. Eine Aufspaltung wie in LDL ist jedoch nicht zu erkennen.

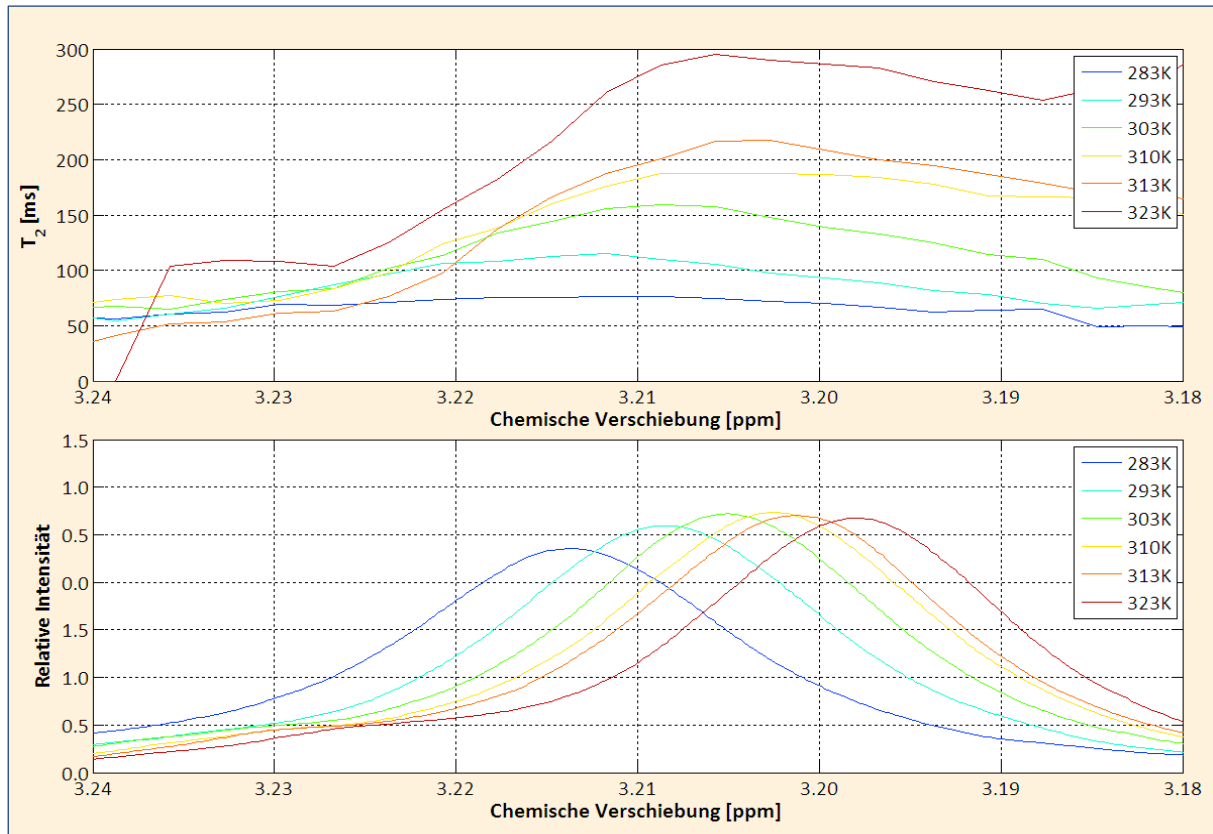
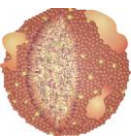


Abb. 4.36: Berechnete T_2 -Zeiten der Cholin-Kopfgruppe in HDL2 (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d gemessen (Abb. 4.33); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz cpmgpr und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (Abb. 4.34); die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zu Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben)

Durch die extrem verbreiterten Linien und die starke Überlagerung der Signale gestaltet es sich extrem schwierig, die Integrale der einzelnen Signale zu bestimmen. Daher wurden für VLDL, LDL und HDL2 die Integrale im Bereich von 3.45 bis -0.25 ppm verwendet (Abb. 4.37). Die Endpunkte befanden sich jeweils in lokalen Minima. Das erste Integral bei 283 K wurde auf einen Wert von 1.0 festgelegt und alle weiteren zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Wie bereits vermutet steigen die Integrale mit der Temperatur stetig an und scheinen zu einem Sättigungswert hin zu tendieren.

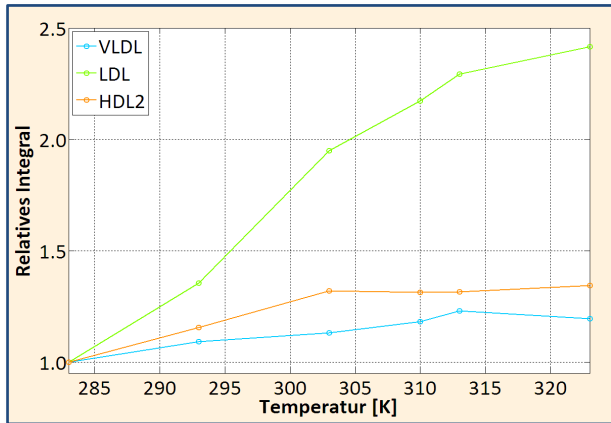
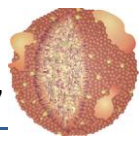


Abb. 4.37: Integrale der temperaturabhängigen NMR-Spektren aus Abb. 4.26, Abb. 4.29 und Abb. 4.33 im Bereich von 3.45 bis -0.25 ppm in Abhängigkeit der jeweiligen Temperatur

In Kapitel 4.1.2.5 wurde ein Vergleich angestellt zwischen den Integralen der wässrigen Proben bei 310 K und denen der daraus extrahierten Lipide. Es stellte sich heraus, dass in VLDL etwa 68% der Signale sichtbar waren, in LDL 74% und in HDL2 58%. Die hier bestimmten relativen Integrale lagen für VLDL bei 1.18 (310 K) und 1.19 (323 K), für LDL bei 2.17 (310 K) und 2.42 (323 K) und für HDL2 bei 1.31 (310 K) und 1.34 (323 K). Das entspricht etwa 90% für LDL und 99% für VLDL und HDL2. Die Integrale bei 323 K entsprechen also noch lange nicht denen der Lipide selbst.



Es wurden schließlich noch temperaturabhängige NMR-Messungen an gesamtem Serum durchgeführt (Abb. 4.38 - Abb. 4.41 und Tab. 4.27). Wie erwartet verhielt sich Serum wie eine Mischung aus den einzelnen Klassen.

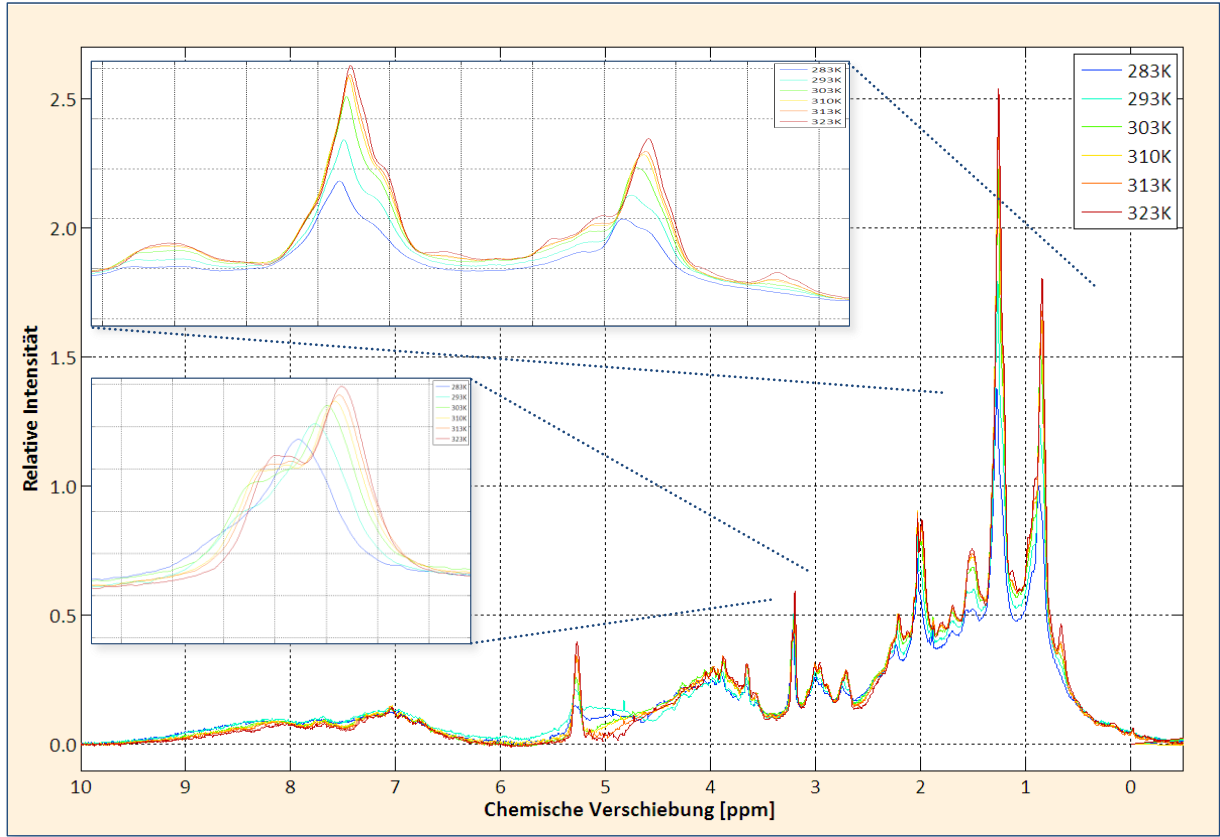


Abb. 4.38: Temperaturabhängige NMR-Spektren von Serum: gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); die Signalhöhe des CH_3 -Peakmaximums (0.8 - 0.9 ppm) der niedrigsten Temperatur wurde auf 1.0 normiert

Temperatur	Chemische Verschiebung [ppm]			Graphische Ansicht
283 K	0.8740	1.2695	3.2113	
293 K	0.8612	1.2634	3.2047	
303 K	0.8538	1.2599	3.2001	
310 K	0.8441	1.2573	3.1970	
313 K	0.8421	1.2553	3.1952	
323 K	0.8386	1.2544	3.1947	

Tab. 4.27: Maxima der NMR-Signale der Cholin-Gruppe bei 3.2 ppm, der CH_2 -Gruppe bei 1.2 ppm und der CH_3 -Gruppe bei 0.8 ppm aus Abb. 4.38; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH_3 -Gruppen aufgetragen

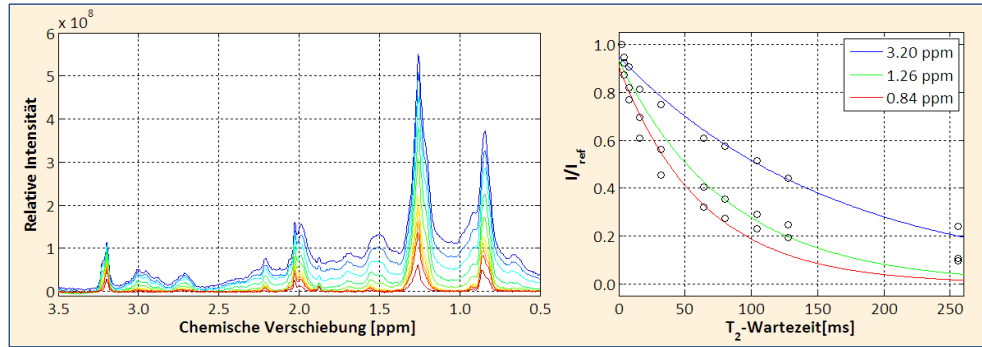


Abb. 4.39: Bestimmung der T_2 -Zeiten ausgewählter Signale in Serum: gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *cpmgrp* und einer Echozeit von 0.5 ms bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); **links:** Gemessene Einzelspektren mit variabler Wartezeit von 2 ms (blau) bis 256 ms (rot); **rechts:** Kurvenverlauf der Intensitäten im Signalmaximum ausgewählter chemischer Verschiebungen, verwendete Fitfunktion: $I(t) = I_0 \exp(-t/T_2)$

Berechnete T_2 -Zeiten von Serum

Cholin : 3.20 ppm: $T_2 = (163.51 \pm 24.66)$ ms

CH₂ : 1.26 ppm: $T_2 = (81.86 \pm 18.41)$ ms

CH₃ : 0.84 ppm: $T_2 = (63.14 \pm 19.88)$ ms

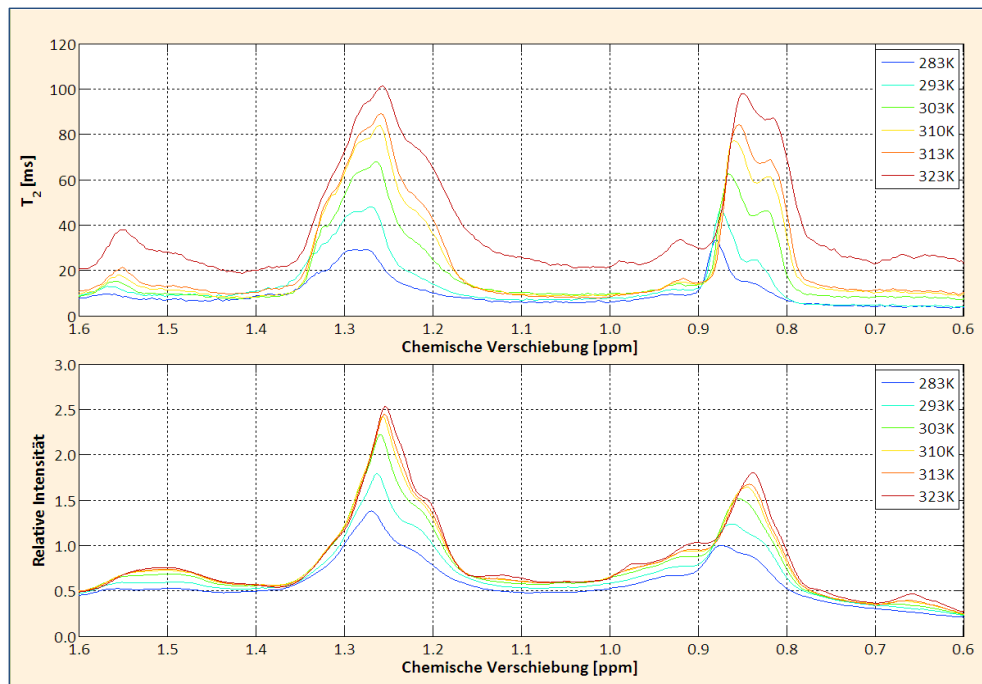


Abb. 4.40: Berechnete T_2 -Zeiten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen in Serum (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* gemessen (**Abb. 4.38**); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *cpmgrp* und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (**Abb. 4.39**); 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (**oben**)

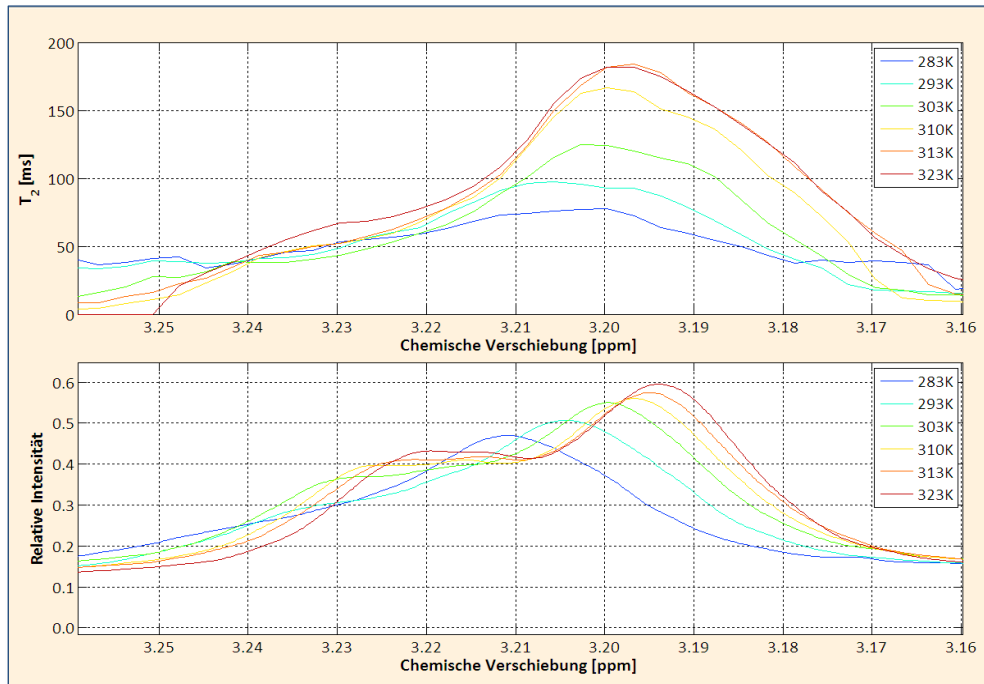
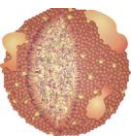


Abb. 4.41: Berechnete T_2 -Zeiten der Cholin-Kopfgruppe in Serum (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (unten): Temperaturabhängige 1D-Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* gemessen (**Abb. 4.38**); Temperaturabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *cpmgrp* und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt (**Abb. 4.39**); 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jeder Temperatur die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (**oben**)

Die T_2 -Werte der Serumproteine (LPDS) wurden hier nicht dargestellt, lagen aber im Mittel immer konstant bei um die 20 ms. Ihr Beitrag ist also verhältnismäßig gering.

In Abb. 4.42 sind alle Spektren nochmals übereinander dargestellt, um einen direkten Vergleich zu sehen. Das Verhalten der separierten Klassen spiegelt sich hier in gewissen Bereichen wieder. VLDL kann man anhand der chemischen Verschiebung dem scharfen Signalmaximum der Methylengruppen zuordnen. Auch die Aufspaltung des Cholin-Kopfgruppen-Signals in LDL kann man deutlich erkennen. Der Unterschied zwischen LDL und HDL2 kann man am besten im unterschiedlichen Intensitätsverhalten ablesen. Während die Temperatur auf LDL einen deutlich stärkeren Einfluss ausübt, nimmt die Intensität bei HDL2 nicht so markant zu. Durch die chemische Verschiebung der jeweiligen Partikel fällt eine Zuordnung natürlich leichter.

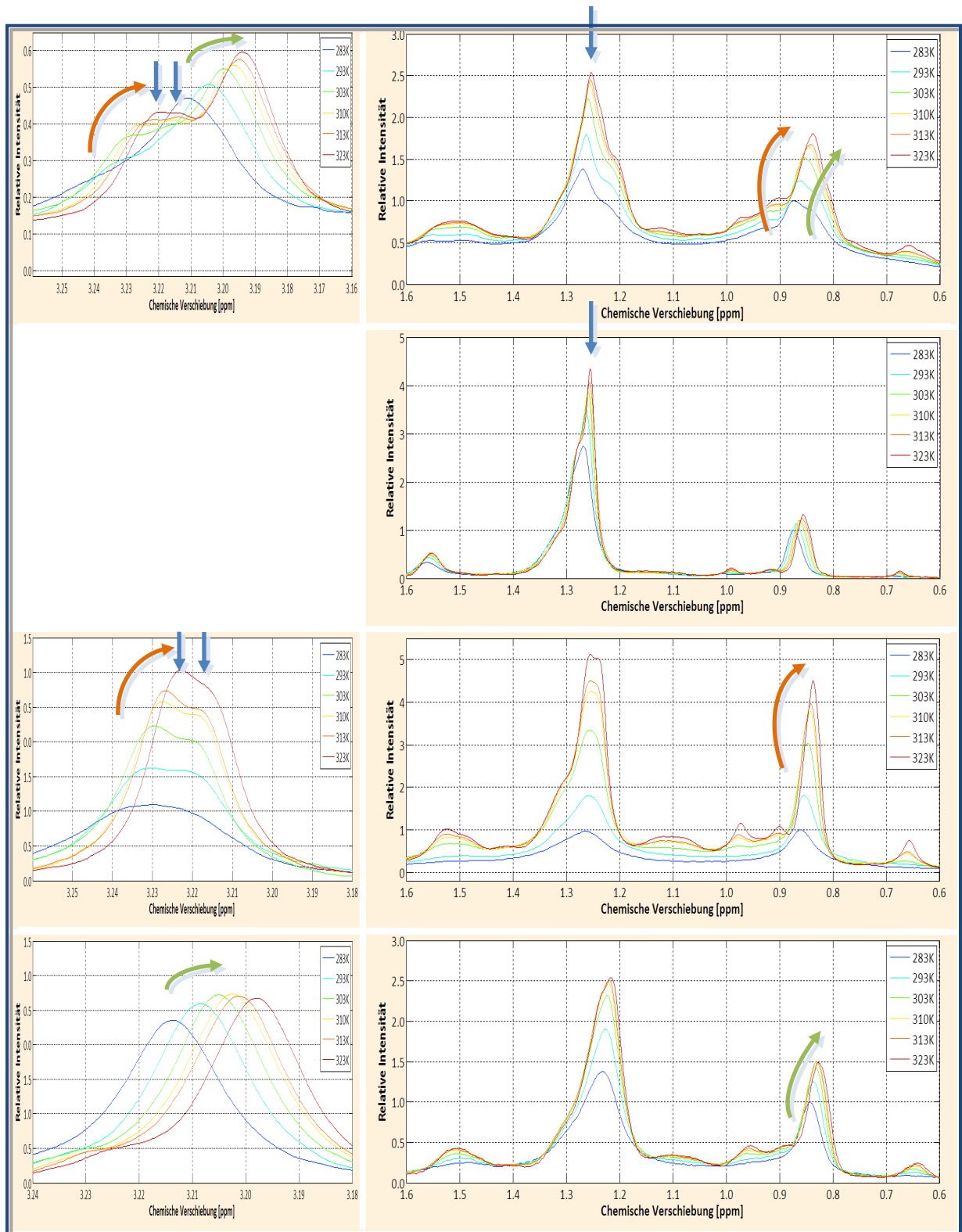
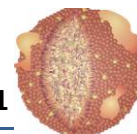


Abb. 4.42: Vergleich der temperaturabhängigen Spektren von Serum (Abb. 4.38), VLDL (Abb. 4.26), LDL (Abb. 4.29) und HDL (Abb. 4.33) (von oben nach unten)



4.2.2 DRUCKABHÄNGIGE NMR-SPEKTROSKOPIE AN SERUM

Die Hochdruck-NMR-Spektroskopie ist eine eindrucksvolle Methode, die zur Strukturaufklärung diverser Biomoleküle beitragen kann. Dies wurde bereits mehrfach gezeigt⁷⁴⁻⁷⁸. Deshalb wurden an Serum Hochdruck-NMR-Messungen durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden. Um unter möglichst physiologischen Bedingungen zu messen, wurde das Serum nicht vorher in extrazellulären Puffer überführt, weshalb sich auch niedermolekulare Substanzen noch in der Lösung enthalten. In Abb. 4.43 sind die druckabhängigen Spektren von Serum bei einer Temperatur von 283 K dargestellt.

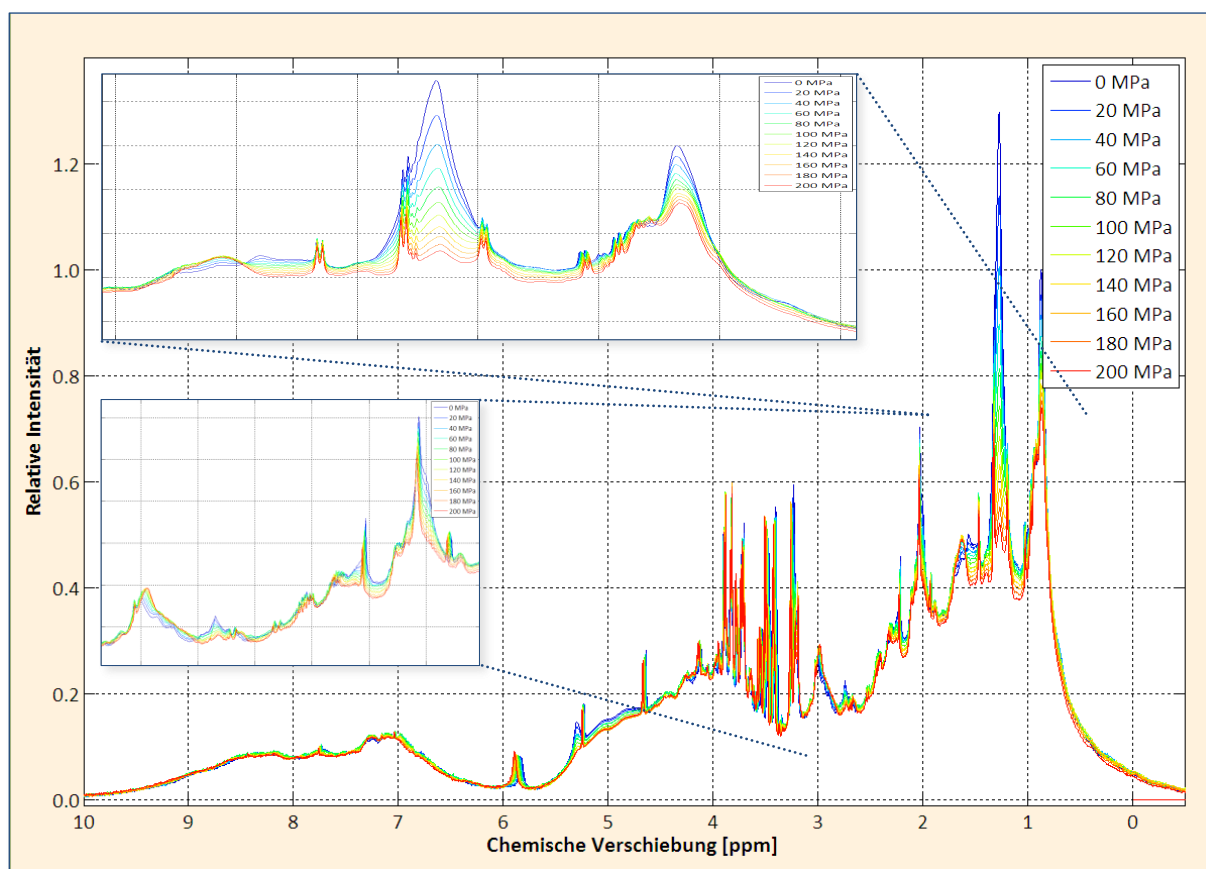


Abb. 4.43: Druckabhängige NMR-Spektren von Serum: gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 283K (für detaillierte Messbedingungen siehe auch Kapitel 3.3.1); 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O und wurden nicht umgepuffert; die Signalhöhe des CH_3 -Peakmaximums (0.8 - 0.9 ppm) des niedrigsten Drucks wurde auf 1.0 normiert; alle Spektren wurden auf die Frequenz von Alanin bei 1.46 ppm referenziert

Durch Druckerhöhung findet genau wie durch Temperaturerhöhung eine leichte Verschiebung zu höheren Feldern statt, wobei höherer Druck die Partikel eigentlich komprimieren und somit einen entgegengesetzten Effekt haben sollte. Die Gesamtintensität nimmt kontinuierlich ab, das CH_2 -Gruppen-Signal dabei deutlich stärker als das der CH_3 -Gruppe. Das Verhalten der Cholin-

Kopfgruppe wird im Folgenden nicht diskutiert, da die Anwesenheit kleiner Moleküle diese stark überlagert.

T_2 -Relaxationszeiten verhalten sich wie erwartet und zeigen eine deutlich geringere Beweglichkeit bei höheren Drücken (Abb. 4.44). Die Werte sind allgemein sehr klein, da man bei einer Temperatur von 283 K schon als Ausgangswert eine sehr kleine T_2 -Zeit hat. Je höher der Druck nun auf die Probe wirkt, desto geringer wird auch die Beweglichkeit der einzelnen Molekülgruppen.

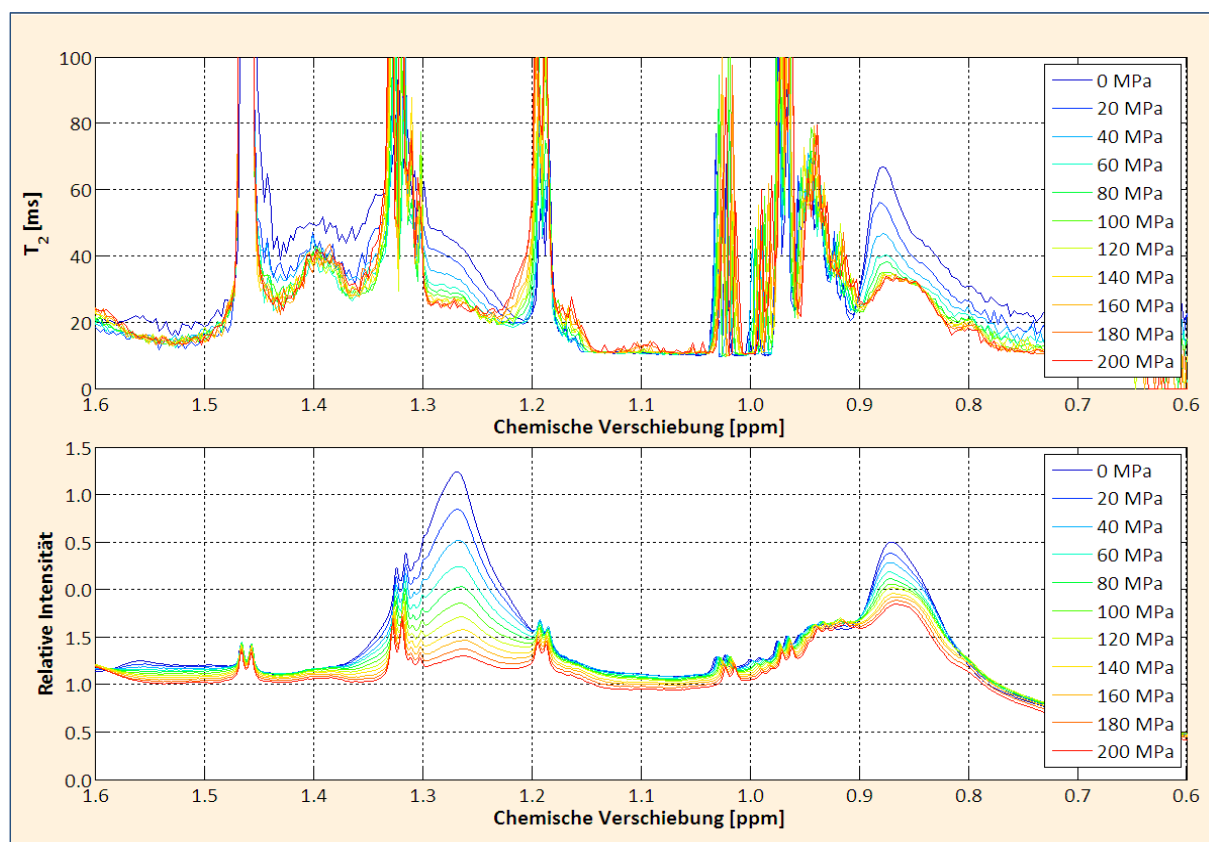
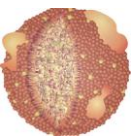


Abb. 4.44: Berechnete T_2 -Zeiten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen in Serum (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Drücken (unten) bei 283K: Druckabhängige 1D-Spektren wurden an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `noesygppr1d` gemessen (Abb. 4.43); Druckabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `cpmgpr` und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O und wurden nicht umgepuffert; zur Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jedem Druck die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben)

Dieselbe Auswertung bei 313 K liefert ähnliche Ergebnisse (Abb. 4.45 und Abb. 4.46). Die Intensität des Methylen-signals nimmt auch bei 313 K stärker ab als die des Methyl-signals. Die chemischen Verschiebungen der Signalmaxima der Methylengruppe bleiben dabei relativ konstant, für die



Methylgruppe kann allerdings eine leichte Verschiebung zu höheren Frequenzen hin beobachtet werden.

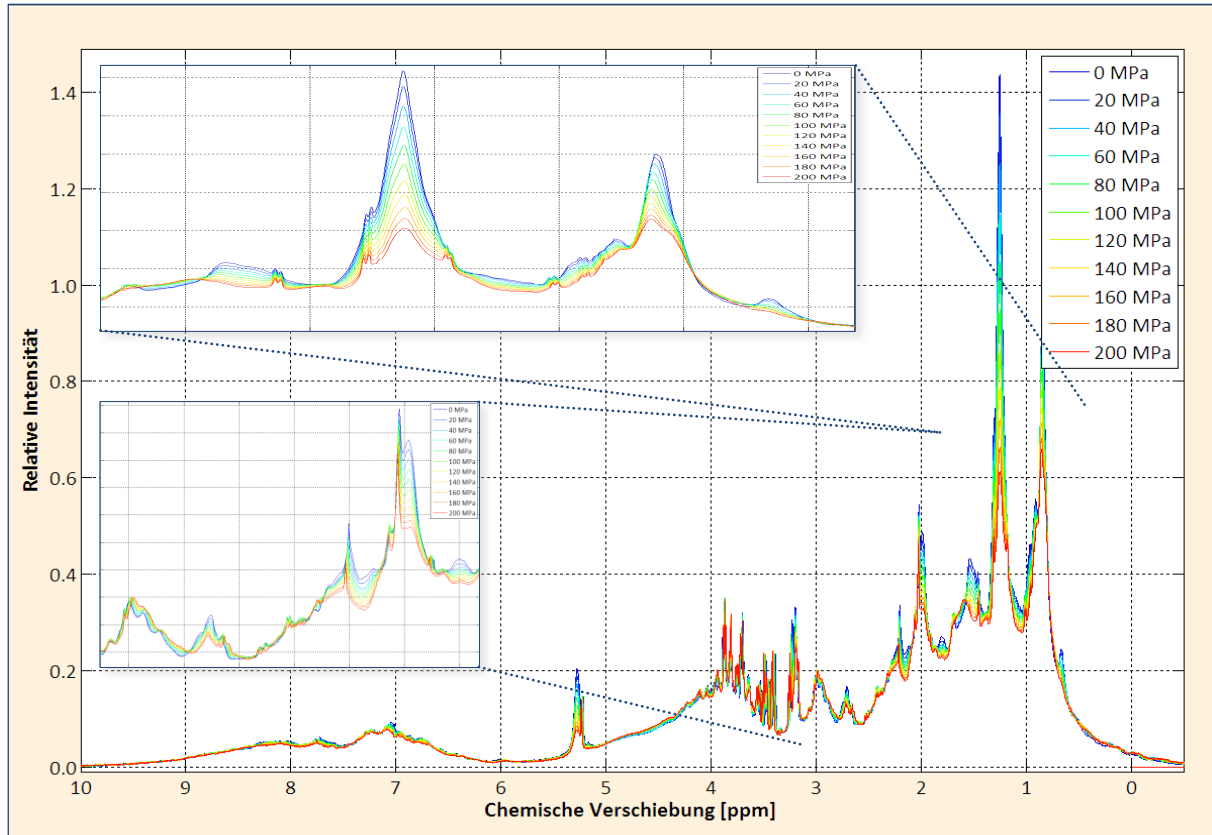


Abb. 4.45: Druckabhängige NMR-Spektren von Serum: gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 313K (für detaillierte Messbedingungen siehe auch Kapitel 3.3.1); 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O und wurden nicht umgepuffert; die Signalhöhe des CH_3 -Peakmaximums (0.8 - 0.9 ppm) des niedrigsten Drucks wurde auf 1.0 normiert; alle Spektren wurden auf die Frequenz von Alanin bei 1.46 ppm referenziert

Die Berechnung der T_2 -Zeiten liefert zwei Signalmaxima für den Bereich der CH_3 -Gruppen wie sie auch bei der Temperaturabhängigkeit zu sehen ist (Abb. 4.40). Dabei ist das hochfeld-verschobene Signal den kleinen Partikeln wie HDL zuzuordnen, das tieffeldverschobene hingegen den größeren Partikeln wie LDL und VLDL, wobei LDL durch die allgemein kleineren T_2 -Zeiten nicht so stark mitwirkt. Die Abnahme der Beweglichkeiten ist über den gesamten Bereich relativ ähnlich.

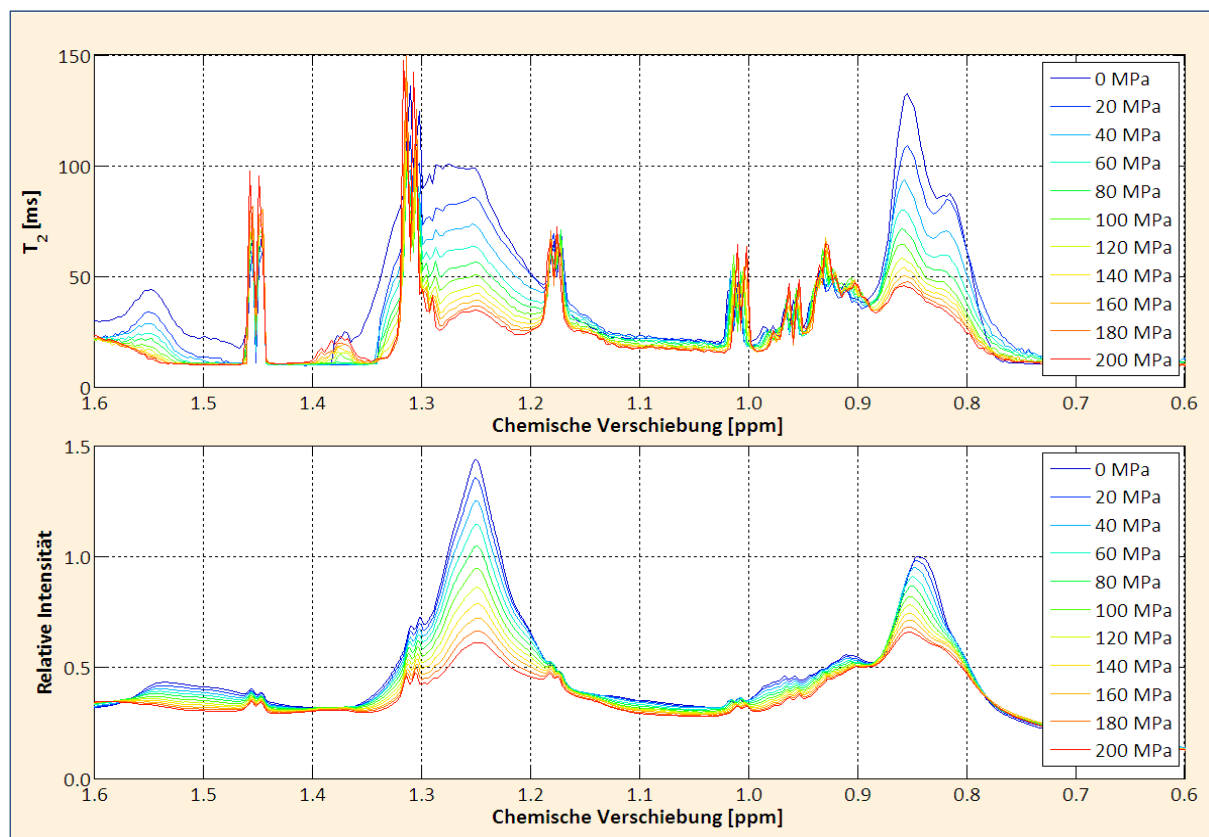


Abb. 4.46: Berechnete T_2 -Zeiten der CH_3 - und CH_2 -Gruppen in Serum (oben), sowie die dazugehörigen NMR-Spektren bei unterschiedlichen Drücken (unten) bei 313K: Druckabhängige 1D-Spektren wurden an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* gemessen (Abb. 4.45); Druckabhängige T_2 -Messungen wurden an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *cpmgpr* und einer Echozeit von 0.5 ms angefertigt; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O und wurden nicht umgepuffert; zu Berechnung wurden die T_2 -gewichteten Spektren zu je 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen von 0.5 bis 3.5 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; anschließend wurde für jede chemische Verschiebung bei jedem Druck die T_2 -Zeit bestimmt und gegen die chemische Verschiebung aufgetragen (oben)

In Abb. 4.47 ist letztendlich zum Vergleich nochmals eine Übersicht des Verhaltens von Serum bei unterschiedlichen Temperaturen und Drücken zusammengestellt.

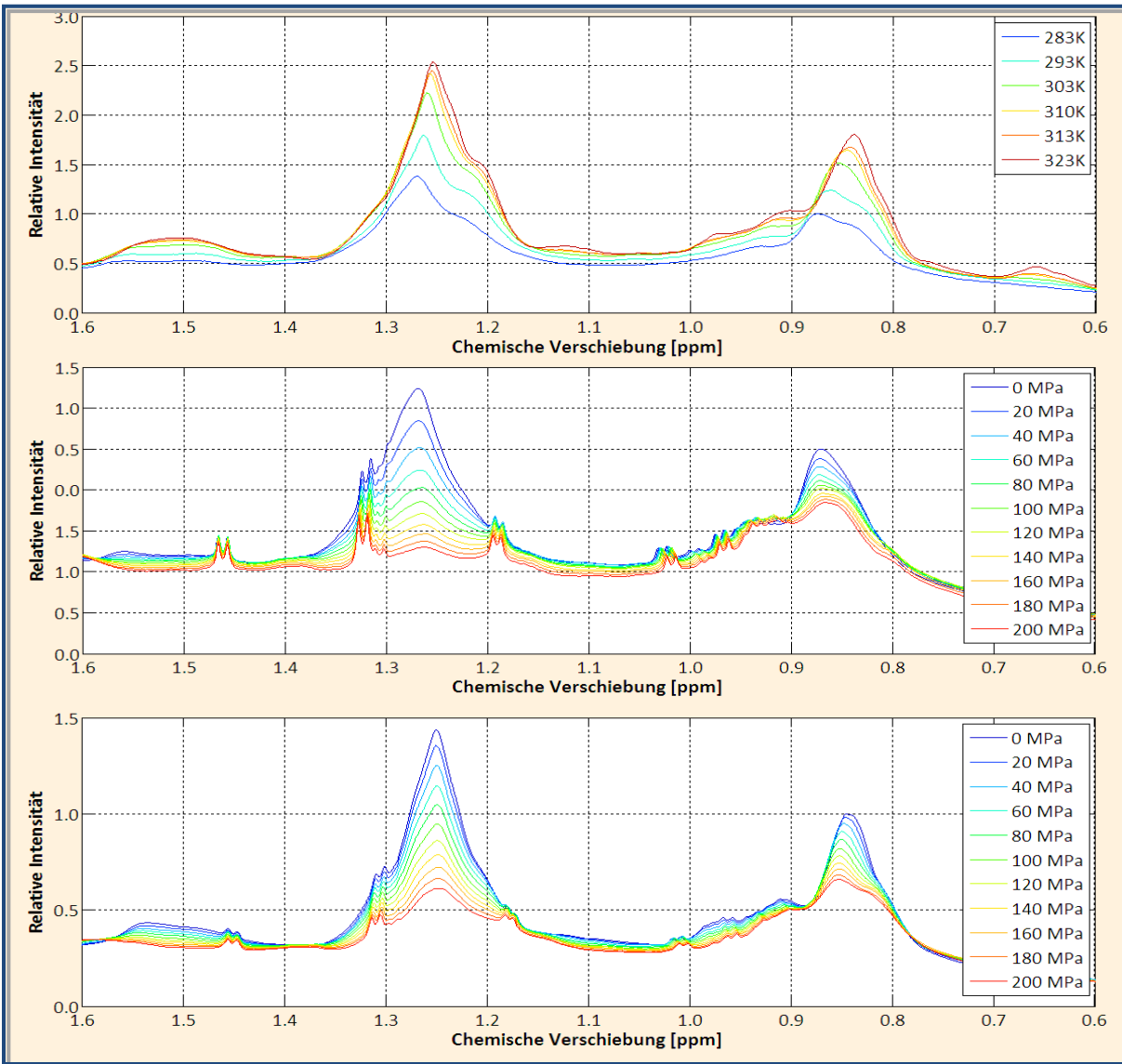
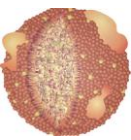


Abb. 4.47: Vergleich der temperaturabhängigen Spektren von Serum (Abb. 4.38) mit den druckabhängigen bei 283K (Abb. 4.43) und bei 313K (Abb. 4.45) (von oben nach unten)

4.3 AUF DER SUCHE NACH APOLIPOPROTEIN-SIGNALEN IN NMR-SPEKTREN VON LIPOPROTEINEN UND SERUM

Das strukturegebende und metabolisch unabdingbare Element der Lipoproteine sind die Proteinanteile, die sogenannten Apolipoproteine. Hauptbestandteil von VLDL, IDL und LDL ist ApoB100, welches in jedem Partikel genau einmal vorkommt und nicht mit anderen Lipoproteinen austauscht. Das Protein ist mit seinen 4536 Aminosäuren und 515 kDa eines der größten bekannten monomeren Proteine überhaupt. Auf der anderen Seite ist ApoAI die wichtigste Proteinkomponente in HDL-Partikeln. Es besitzt 243 Aminosäuren, hat eine Masse von 28 kDa und kann zwischen verschiedenen Lipoproteinen austauschen. Beide Proteine sind über weite Flächen der Lipoproteine verteilt⁷⁹⁻⁸¹.

Der Anteil an Protein zu Lipid sinkt mit steigender Größe der Lipoproteine⁸¹, so dass in einem NMR-Spektrum von VLDL kaum Signale der Proteinkomponenten zu erwarten sind. In kleineren Partikeln ist das Verhältnis schon deutlich ausgewogener. In Kapitel 4.1.6 wurde eine Abschätzung der molaren Masse aller Lipide in LDL und HDL vorgenommen (siehe Tab. 4.17 und Tab. 4.18). Die Gesamtlipid-Masse wurde in LDL zu etwa 2000 kDa bestimmt, in HDL zu 140 kDa. Da in LDL nur ein Molekül ApoB100 mit 515 kDa vorkommt, macht das einen Anteil von 20% aus. In HDL ist die Anzahl von ApoAI (28 kDa) variabel, außerdem sind noch weitere periphere Apolipoproteine wie ApoAII, ApoC und ApoE vorhanden¹⁴. Geht man aber von mindestens einem Protein aus, wären das ebenfalls knapp 20%, eher aber deutlich mehr. Es sollten also einige Apoproteinsignale in einem NMR-Spektrum sichtbar sein, vorausgesetzt sie sind beweglich genug, dass eine Detektion möglich ist.

Am deutlichsten kann man Proteinsignale im Frequenzbereich von 6-10 ppm erkennen. Hier befinden sich die Signale der NH-Gruppen des Peptid-Rückgrats, aber auch einige Signale der aromatischen Seitenketten der Aminosäuren, allerdings keinerlei Lipidsignale. In Abb. 4.48 sind die NMR-Spektren von Serum, den verschiedenen Lipoproteinklassen und dem Proteinanteil aus Kapitel 4.1.1 gezeigt.

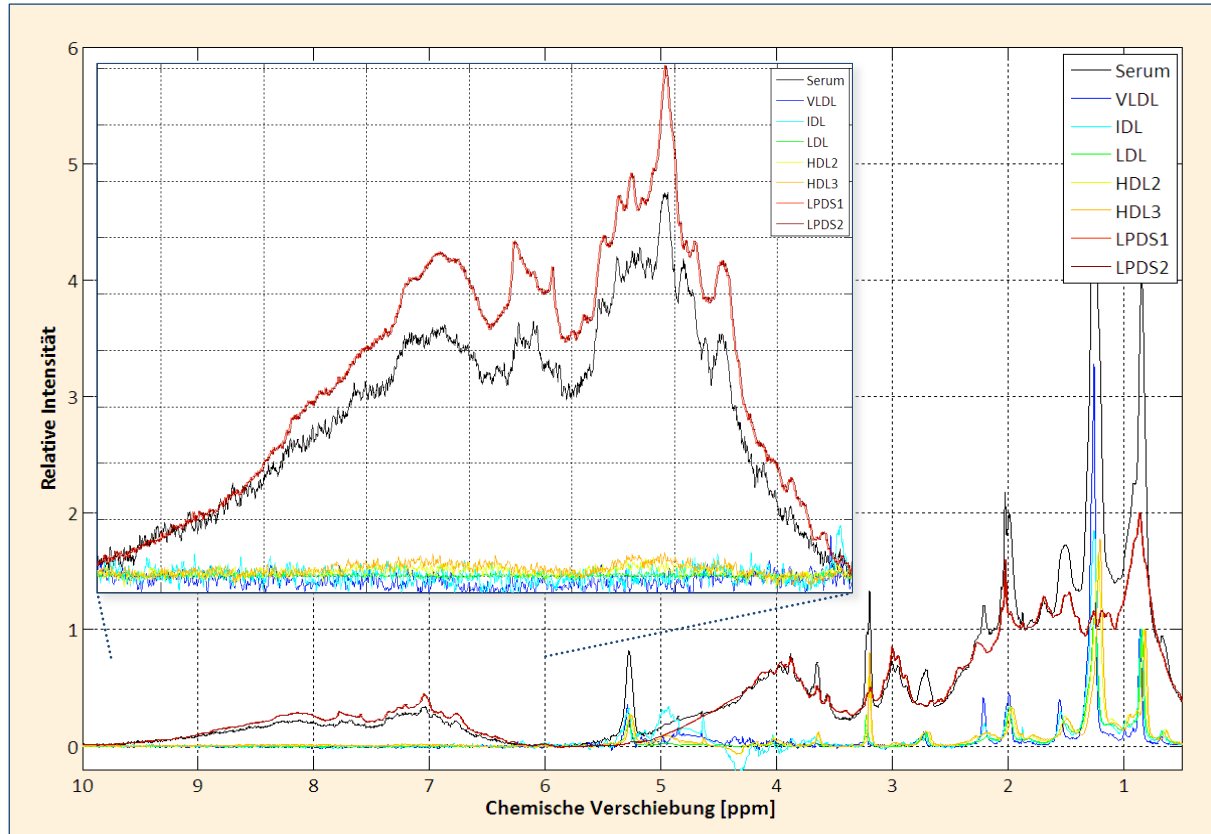
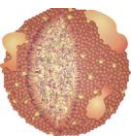


Abb. 4.48: NMR-Spektren von Serum, Lipoproteinfraktionen (VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3) und Proteinfraktionen (LPDS1 und LPDS2): die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Lipoproteinspektren auf 1.0 normiert, die der Proteine auf 2.0 und des Serumspektrums auf 4.0

Im NH- und Aromatenbereich findet man besonders bei Serum und den freien Proteinen (LPDS) einen breiten Signalbereich, der eine sehr ähnliche Form aufweist und überwiegend aus Albumin, Immunglobulinen und anderen Serumproteinen resultiert. Aber auch bei HDL2 und HDL3 kann man schon schwache Signale erkennen. In Abb. 4.49 sind die Spektren von Serum, HDL, LDL und zwei Serumprotein-Fractionen dargestellt, die mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis gemessen wurden, um die Signale deutlich zu erkennen.

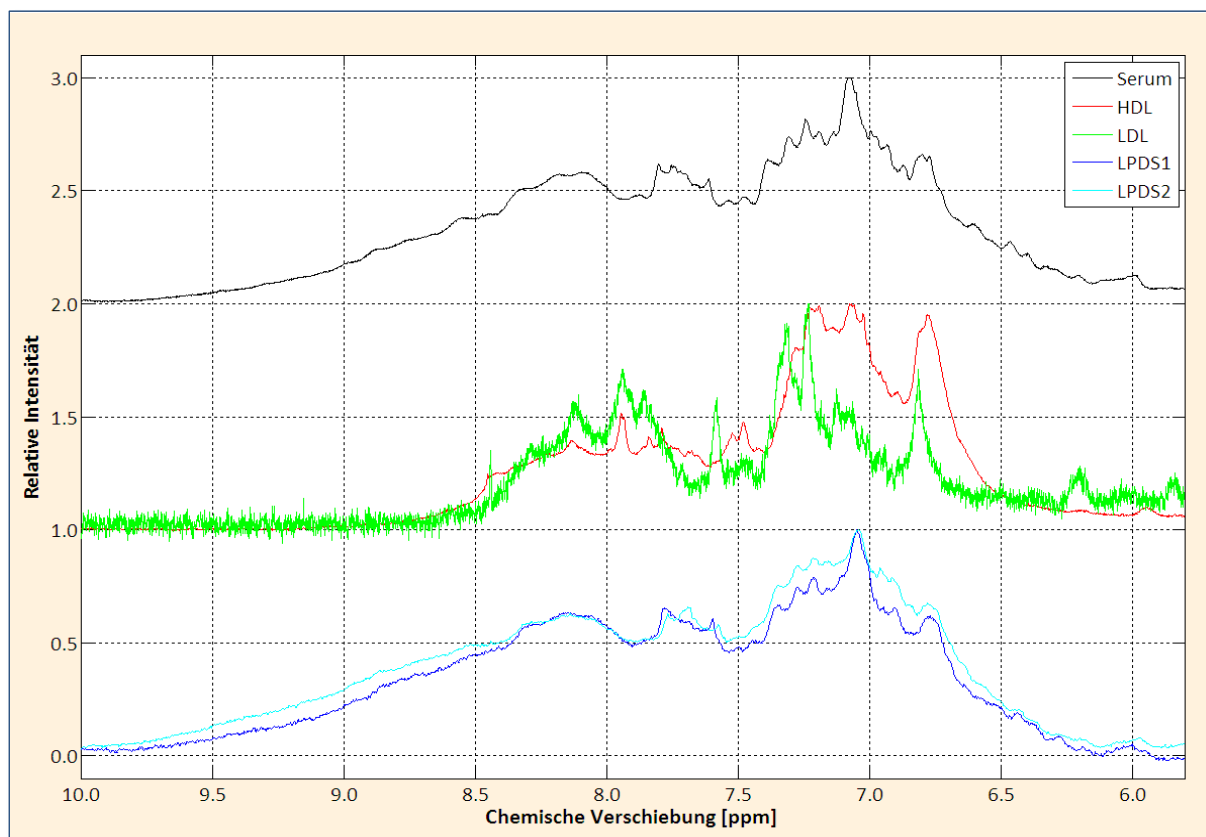
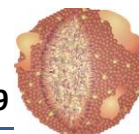


Abb. 4.49: NMR-Spektren von Serum, HDL, LDL und zwei Serumprotein-Fractionen (LPDS): Serum wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d mit einer Scanzahl von 8 bei 310 K gemessen; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); HDL und LDL wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz zgpgw5 ohne FID Baseline-Korrektur (siehe Kapitel 3.3.1) mit einer Scanzahl von 1024 bei 310 K; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in PBS-Puffer (pH 7.4); LPDS1 und LPDS2 zwei wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d mit einer Scanzahl von 8 bei 310 K; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der dominierenden Aromatensignale der Proteine (6.0 - 8.0 ppm) auf 1.0 normiert

Die Signalmuster weisen deutliche Unterschiede in Kurvenform und Intensität auf. Möglicherweise ist schon anhand eines einzelnen Signals die Anwesenheit von bestimmten Apolipoproteinen in Serum nachweisbar.

In Kapitel 4.1.4 wurde bereits ausführlich darauf eingegangen, dass die einzelnen Lipoproteinklassen in Serum durch ihre differierende Größe zu unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten führen. Außerdem wurde anhand von Diffusionsmessungen an Serum versucht, durch mathematische Zerlegung auf die ursprüngliche Zusammensetzung der Komponenten zu schließen. Im Folgenden wurde dieselbe Prozedur auf den NH- und Aromatenbereich von Serum angewendet.



In Abb. 4.50 sind diffusionsgewichtete NMR-Spektren dargestellt. Besonderes Augenmerk wurde bei der Messung darauf gelegt, dass die Signale zwischen 6-10 ppm einen schönen Diffusionsverlauf zeigen. Daher wurde eine Diffusionszeit von 35 ms und ein Gradientenpuls von 2.5 ms verwendet (siehe Kapitel 3.3.4). Der Signalabfall war nun für die anderen Signale deutlich geringer.

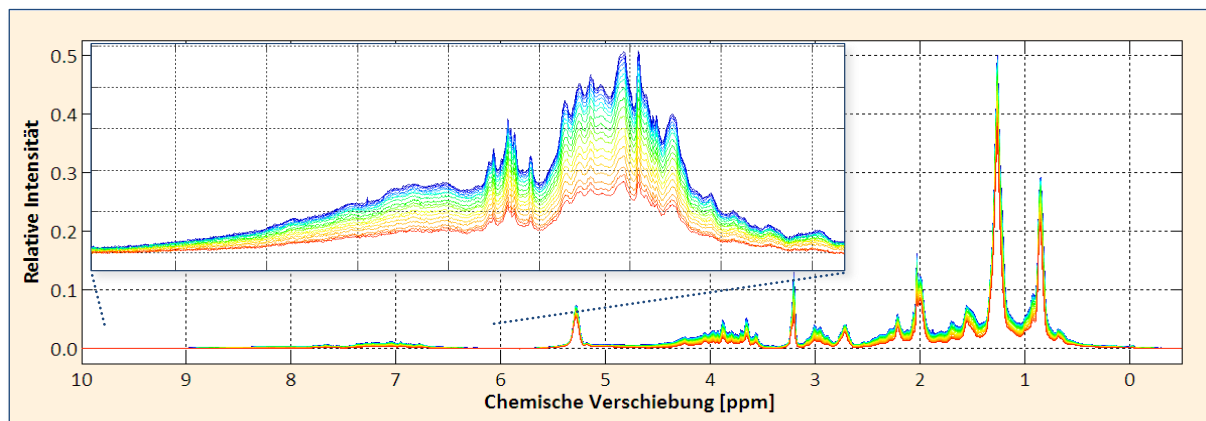


Abb. 4.50: Diffusionsspektren von Serum mit variabler Gradientenstärke von 5% (blau) bis 90% (rot) in 5%-Schritten: Gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz *ledbgppr2s*, einer Diffusionszeit von 35 ms und einem Gradientenpuls von 2.5 ms bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurde die Signalhöhe der dominierenden Aromatensignale der Proteine (6.0 - 8.0 ppm) des ersten Spektrums auf 1.0 normiert

Trotz des geringeren Signalabfalls war es möglich die Diffusionskoeffizienten auch im Bereich der CH_3 -Gruppen zu bestimmen. Wie bereits mehrfach erwähnt, zeigen größere Lipoproteine eine Verschiebung hin zu höheren Frequenzen, so dass ihre Maxima sich auf der tieffeldverschobenen Seite der Signale befinden. Da von dieser Probe keine separate Isolierung aller Lipoproteinklassen durchgeführt wurde, wurden die Diffusionskoeffizienten anhand verschiedener Verschiebungen innerhalb des CH_3 -Gruppen-Signals abgeschätzt. Es wurde also der Signalabfall bei 0.80 ppm bis 0.88 ppm in 0.01 ppm-Schritten betrachtet. Zusätzlich wurden die Diffusionskoeffizienten bei 3.00 ppm bestimmt, da sich in dem Bereich ausschließlich Proteinsignale befinden (siehe Abb. 4.2), und bei einigen Signalmaxima im Bereich der NH- und Aromatensignale. Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten ist in Abb. 4.51 zusammengestellt.

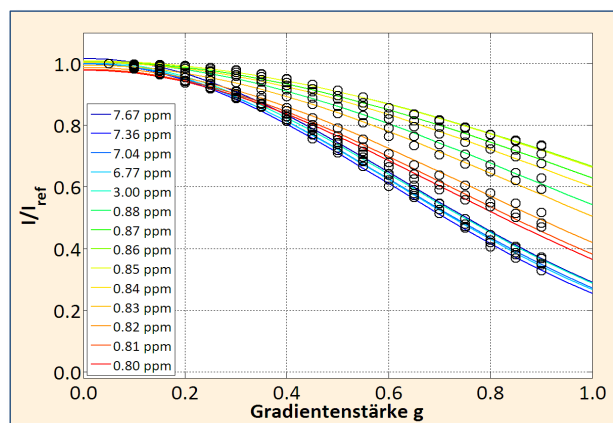


Abb. 4.51: Berechnung der Diffusionskoeffizienten der Protein-NH-Signale (6.0-10.0 ppm) und der CH_3 -Gruppen verschiedener Partikel in Serum aus Abb. 4.50: aufgetragen wurden die Intensitäten einiger Signalmaxima im Bereich von 6.0-10.0 ppm, 3.0 ppm und 0.8-0.88 ppm: verwendete Fitfunktion: $I(g) = I_0 (\exp(-c \cdot D \cdot g^2))$; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.48 und Abb. 4.50; die Diffusionskoeffizienten sind aufgrund der variierenden Spektrometerkonstanten nicht ganz korrekt, sind aber relativ zueinander konsistent und liefern eine gute Abschätzung (siehe Kapitel 3.3.4)

Berechnete Diffusionskoeffizienten

NH und Aromaten (Proteine):

7.67 ppm: $D = (7.07 \cdot 10^{-11} \pm 0.19 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

7.36 ppm: $D = (7.73 \cdot 10^{-11} \pm 0.13 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

7.04 ppm: $D = (7.34 \cdot 10^{-11} \pm 0.10 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

6.77 ppm: $D = (7.47 \cdot 10^{-11} \pm 0.14 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

H_β (Proteine):

3.00 ppm: $D = (7.07 \cdot 10^{-11} \pm 0.08 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH_3 :

0.88 ppm: $D = (3.49 \cdot 10^{-11} \pm 0.12 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.87 ppm: $D = (2.65 \cdot 10^{-11} \pm 0.11 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.86 ppm: $D = (2.33 \cdot 10^{-11} \pm 0.10 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.85 ppm: $D = (2.36 \cdot 10^{-11} \pm 0.10 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.84 ppm: $D = (2.91 \cdot 10^{-11} \pm 0.10 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.83 ppm: $D = (3.83 \cdot 10^{-11} \pm 0.13 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.82 ppm: $D = (4.83 \cdot 10^{-11} \pm 0.19 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

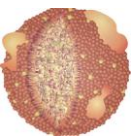
0.81 ppm: $D = (5.34 \cdot 10^{-11} \pm 0.24 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

0.80 ppm: $D = (5.58 \cdot 10^{-11} \pm 0.28 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

Wie erwartet kann man eine hohe Beweglichkeit bei 0.80 ppm erkennen, die kontinuierlich zu höheren Frequenzen und somit zu größeren Partikeln hin abnimmt. Ab 0.87 ppm kann man wieder einen Anstieg erkennen, der auf den Überlapp des Nachbarsignals kleinerer Partikel zurückzuführen ist. Aus Tab. 4.1 in Kapitel 4.1.1 geht hervor, dass HDL3 ein Signalmaximum bei 0.8142 ppm besitzt, HDL2 bei 0.8290 ppm und LDL bei 0.8419 ppm. Es wurden daher für die Berechnung die Diffusionskoeffizienten von 0.80 ppm bis 0.83 ppm berücksichtigt, da für kleinere Partikel der Proteinanteil höher ist und somit auch die Wahrscheinlichkeit, ein Signal dieser zu identifizieren. Für LPDS wurde der Diffusionskoeffizient bei 3.00 ppm verwendet (Tab. 4.28).

Lipoproteinklasse	HDL2, HDL3 und eventuell LDL (0.83-0.80 ppm)				LPDS
Diffusionskoeffizient [m^2/s]	$3.83 \cdot 10^{-11}$	$4.83 \cdot 10^{-11}$	$5.34 \cdot 10^{-11}$	$5.58 \cdot 10^{-11}$	$7.07 \cdot 10^{-11}$

Tab. 4.28: Verwendete Diffusionskoeffizienten für die Berechnung des Verhältnisses der Lipoproteine und Serumproteine (LPDS)



Nun wurde wieder dieselbe Berechnung wie in Kapitel 4.1.4 durchgeführt. Die zuvor bestimmten Diffusionskoeffizienten wurden als feste Werte vorgegeben, um die Signalintensitäten der Diffusionsmessungen bei jeder chemischen Verschiebung zu fitten. Dabei war das Verhältnis variabel (Abb. 4.52 und Abb. 4.53).

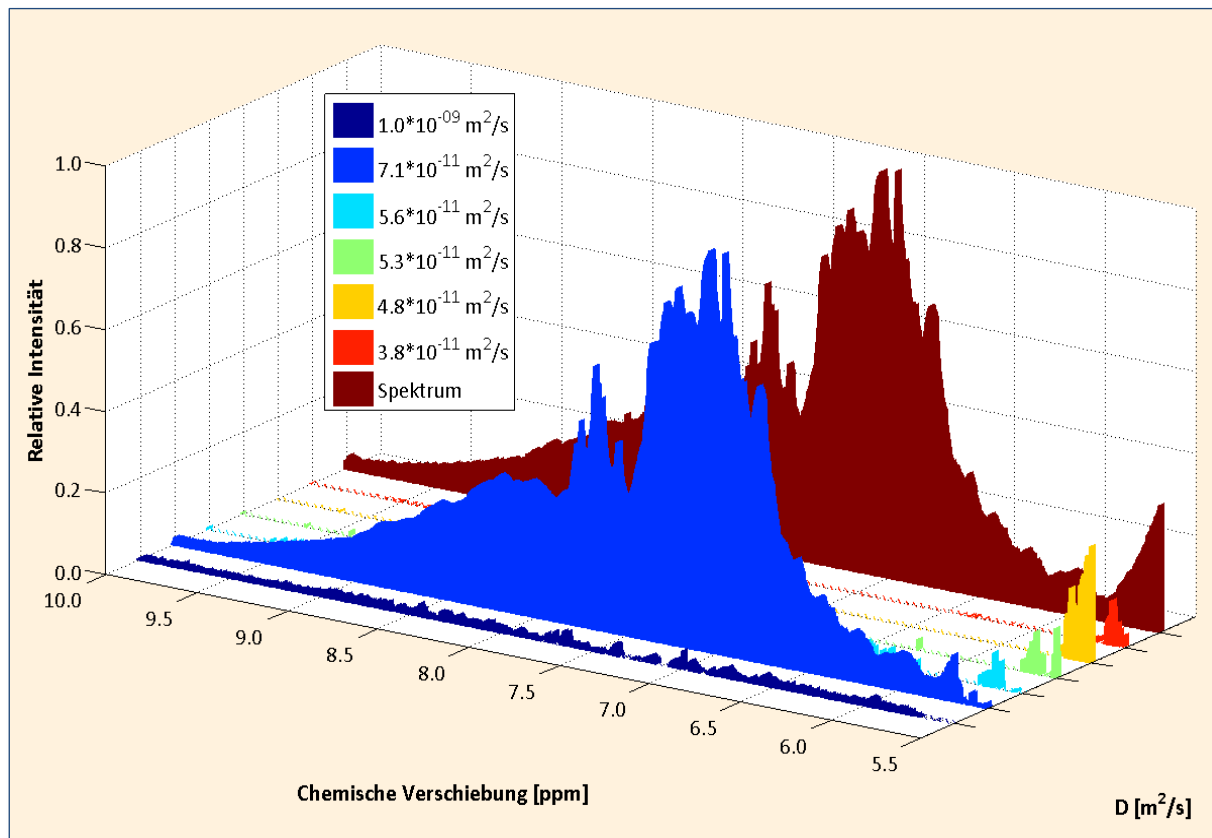


Abb. 4.52: Berechnete Anteile der Lipoproteinklassen im NH- und Aromatenbereich der Proteine in Serum: die Spektren der NMR-Diffusionsmessungen an Serum (Abb. 4.50) wurden zu 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen im Bereich von 5.5 bis 10.0 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; die jeweiligen Intensitäten wurden mit den Diffusionskonstanten (D) aus Tab. 4.28 gegen die Gradientenstärke aufgetragen und so gefittet, dass der Anteil jedes Diffusionskoeffizienten variabel war und als Summe wieder im Originalsignal resultierten; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.48 und Abb. 4.50

Es zeigt sich, dass die Spektren im Rahmen der Messgenauigkeit ausschließlich mit Hilfe des einen Diffusionskoeffizienten des freien Proteins gefittet werden konnten. Dies ist plausibel, wenn man die Intensitätsverhältnisse der Spektren berücksichtigt. Mit dieser Methode war es also nicht möglich spezifische Proteinsignale zu detektieren.

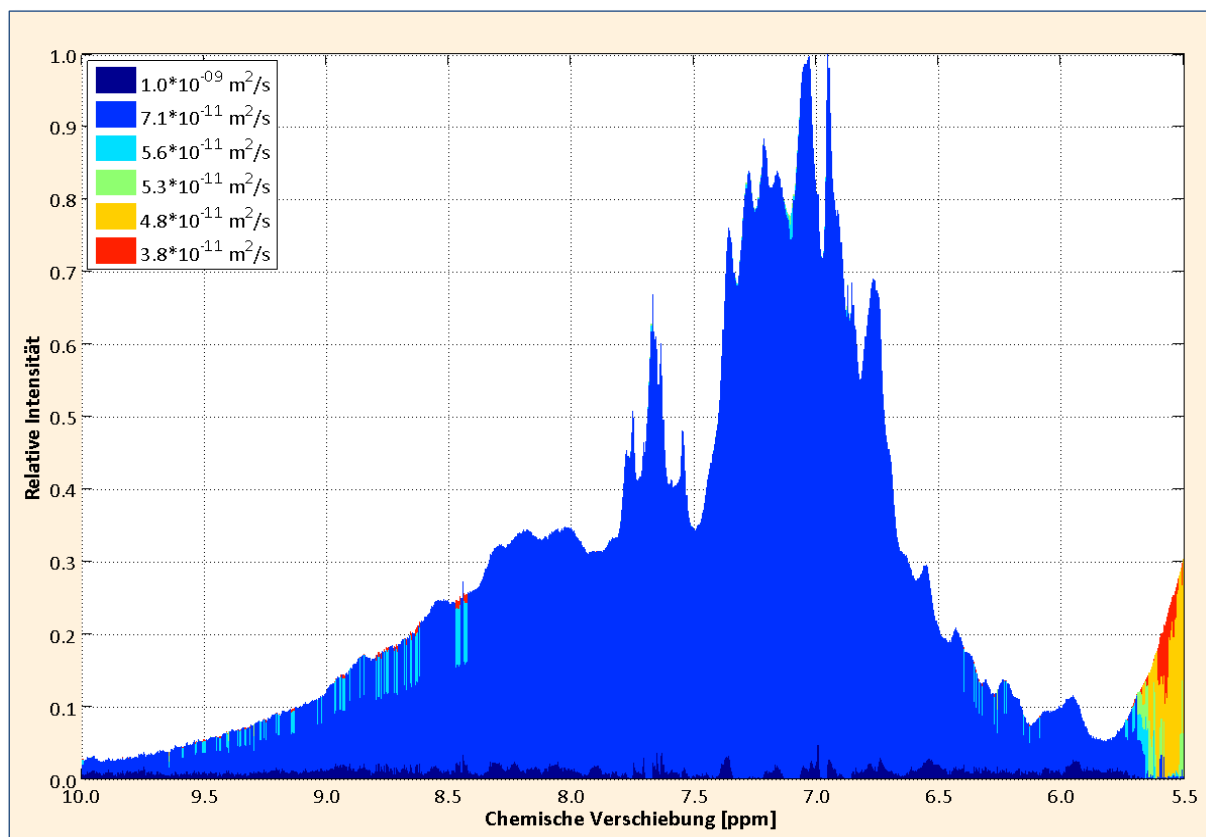


Abb. 4.53: Berechnete Anteile der Lipoproteinklassen im NH- und Aromatenbereich der Proteine in Serum (alternative Darstellung durch Addition aller Komponenten aus Abb. 4.52, Gesamtkurvenform entspricht dem Originalserum): die Spektren der NMR-Diffusionsmessungen an Serum (Abb. 4.50Abb. 4.20) wurden zu 1000 äquidistanten chemischen Verschiebungen im Bereich von 5.5 bis 10.0 ppm in MATLAB eingelesen und interpoliert; die jeweiligen Intensitäten wurden mit den Diffusionskonstanten (D) aus Tab. 4.28 gegen die Gradientenstärke aufgetragen und so gefittet, dass der Anteil jedes Diffusionskoeffizienten variabel war und als Summe wieder im Originalsignal resultierten; für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.48 und Abb. 4.50

Eine bessere Aussage kann man treffen, wenn man die diffusionsgewichteten Spektren bei 5% und 90% Gradientenstärke übereinander legt und voneinander subtrahiert (Abb. 4.54). Bei 90% ist das Signal der Serumproteine schon weitgehend abgefallen, das der Lipoproteine entsprechend höher gewichtet. Im Differenzspektrum kann man nun die relativen Signaländerungen besser erkennen. Bei etwa 7.7 ppm, sowie zwischen 6.8 und 7.4 ppm sind leichte Abweichungen des Differenzspektrum von 0 zu erkennen. Diese korrelieren gut mit dem Spektrum der Serumproteine LPDS2, allerdings nicht mit denen von HDL oder LDL.

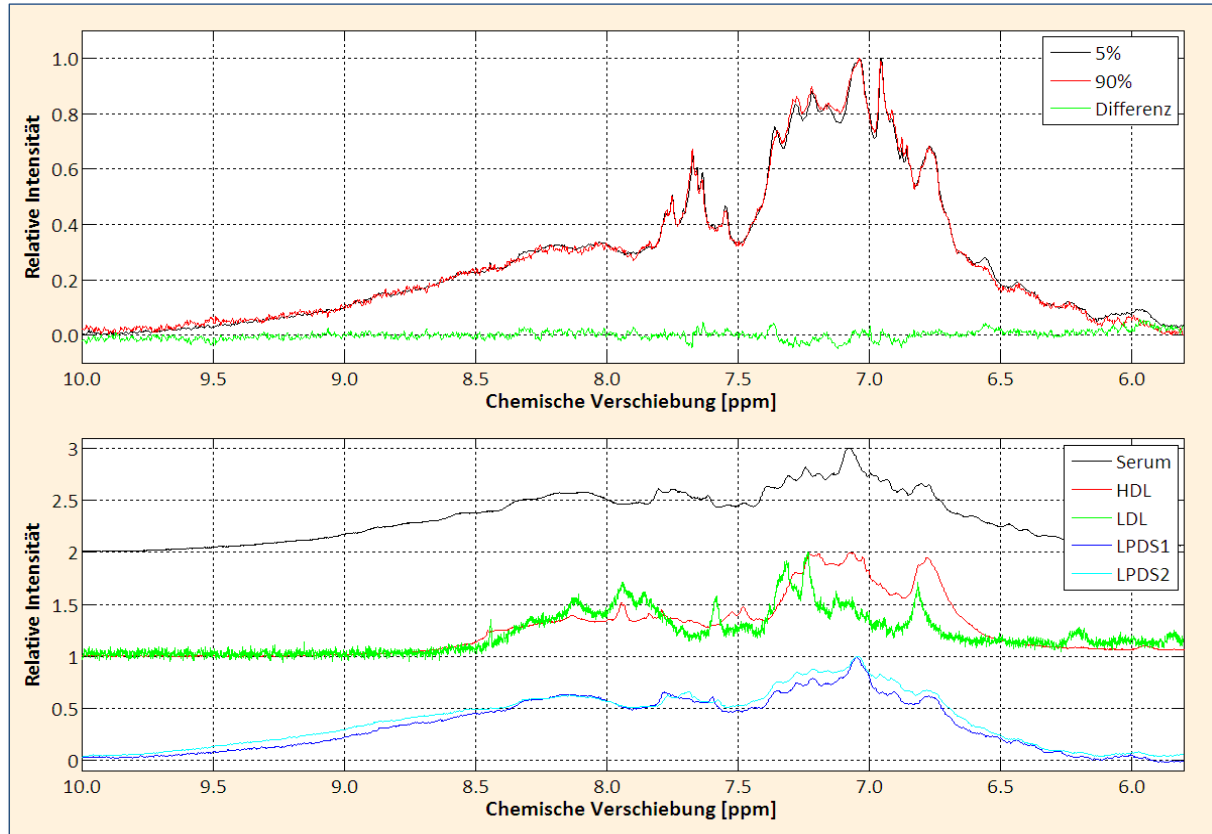
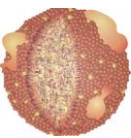


Abb. 4.54: Differenz der diffusionsgewichteten Spektren bei 5% und 90% Gradientenstärke aus Abb. 4.50 (oben) und zum Vergleich dazu NMR-Spektren von Serum, HDL, LDL und zwei Serumprotein-Fractionen (LPDS), jeweils im Bereich der NH- und Aromatensignale der Proteine: zur Differenzbildung wurden die diffusionsgewichteten Spektren so korrigiert, dass ihr Minimum bei 0.0 und ihr Maximum bei 1.0 lag, anschließend wurde das 90%-Spektrum von dem 5%-Spektrum subtrahiert

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine spezifischen Signale der Apolipoproteine in Serum detektiert werden konnten. Zum einen ist die Konzentration der freien Proteine in Serum um ein Vielfaches höher, zum anderen ist die Beweglichkeit der Apolipoproteine durch ihre Einbindung in die Lipoproteinpartikel eingeschränkt.

4.4 VERGLEICH VERSCHIEDENER SEPARATIONSMETHODEN VON LIPOPROTEINEN

4.4.1 SUBFRAKTIONIERUNG VON HDL

Es wurde vielfach gezeigt, dass Lipoproteine sowohl mit Hilfe der Ultrazentrifugation^{43, 82-87} als auch über Größenausschluss-Chromatographie, beziehungsweise Gelfiltration⁸⁸⁻⁸⁹, präparativ in diverse Subklassen zerlegt werden können.

Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Die Gelfiltration ist eine vergleichsmäßig milde Methode mit einfacher Visualisierung, die hohe Ausbeuten liefert und analytisch und präparativ nutzbar ist, allerdings werden die separierten Proben stark verdünnt. Bei der Ultrazentrifugation erfolgt keine Verdünnung, dafür sind die Proben dabei enormen Kräften und hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt⁹⁰.

Um einen direkten Vergleich der Separationsmethoden zu sehen, wurde mittels sequenzieller Ultrazentrifugation HDL2 und HDL3 gewonnen. Dieses wurde zum einen durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation mit einem Optiprep-Gradienten in Subfraktionen zerlegt (Abb. 4.55), zum anderen wurden Aliquots derselben Proben ebenfalls über eine Gelfiltrationssäule mit Superdex 200 subfraktioniert. Das verwendete Serum stammte von zwei männlichen Spendern mit hohen HDL-Cholesterinwerten von 45 mg/dL und 77 mg/dL und niedrigen LDL-Cholesterinwerten von 81 mg/dL und 75 mg/dL und wurde vor der Separation vereinigt.

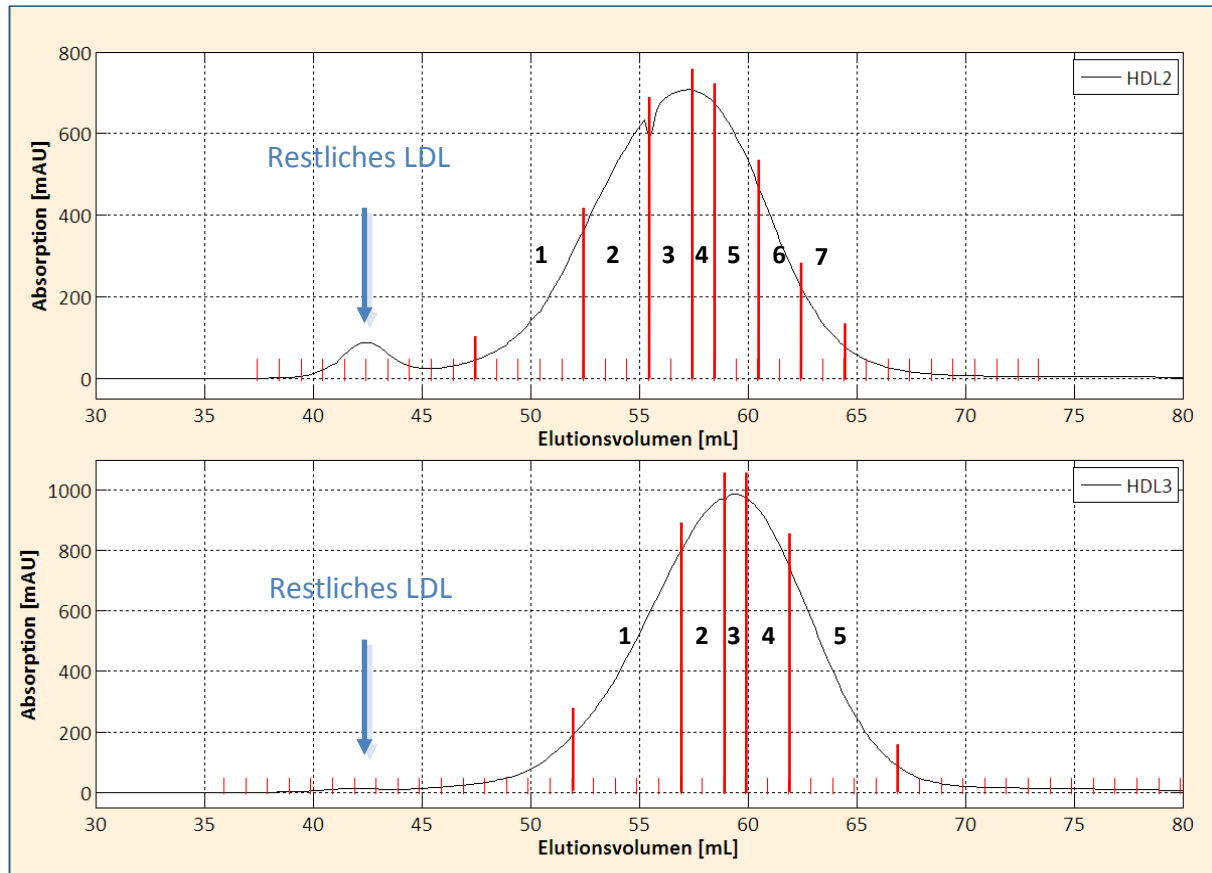
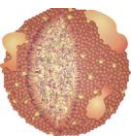


Abb. 4.55: Elutionsprofil der HDL-Subfraktionen: Die Separation erfolgte an einem ÄKTA-FPLC-System mit Frac-900-Fraktioniereinheit über eine C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 200 prep grade bei 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min; aufgetragen wurden jeweils 1.5 mL isoliertes HDL2 (**oben**) oder HDL3 (**unten**), in Fraktionen von je 1 mL geschnitten und zu 7, beziehungsweise 5 Subfraktionen vereinigt

Die Proben wurden zusammen mit einem Proteinstandard auf Gradientengele aufgetragen (Abb. 4.56). Beide Trennmethode lieferten zufriedenstellende Ergebnisse, so dass eine kontinuierliche Größentrennung der HDL-Subfraktionen zu erkennen war, die im Bereich von etwa 8-10 nm lag. Anhand der Lage im Gel wurden einige Proben ausgewählt, die für die anschließenden Untersuchungen verwendet wurden.

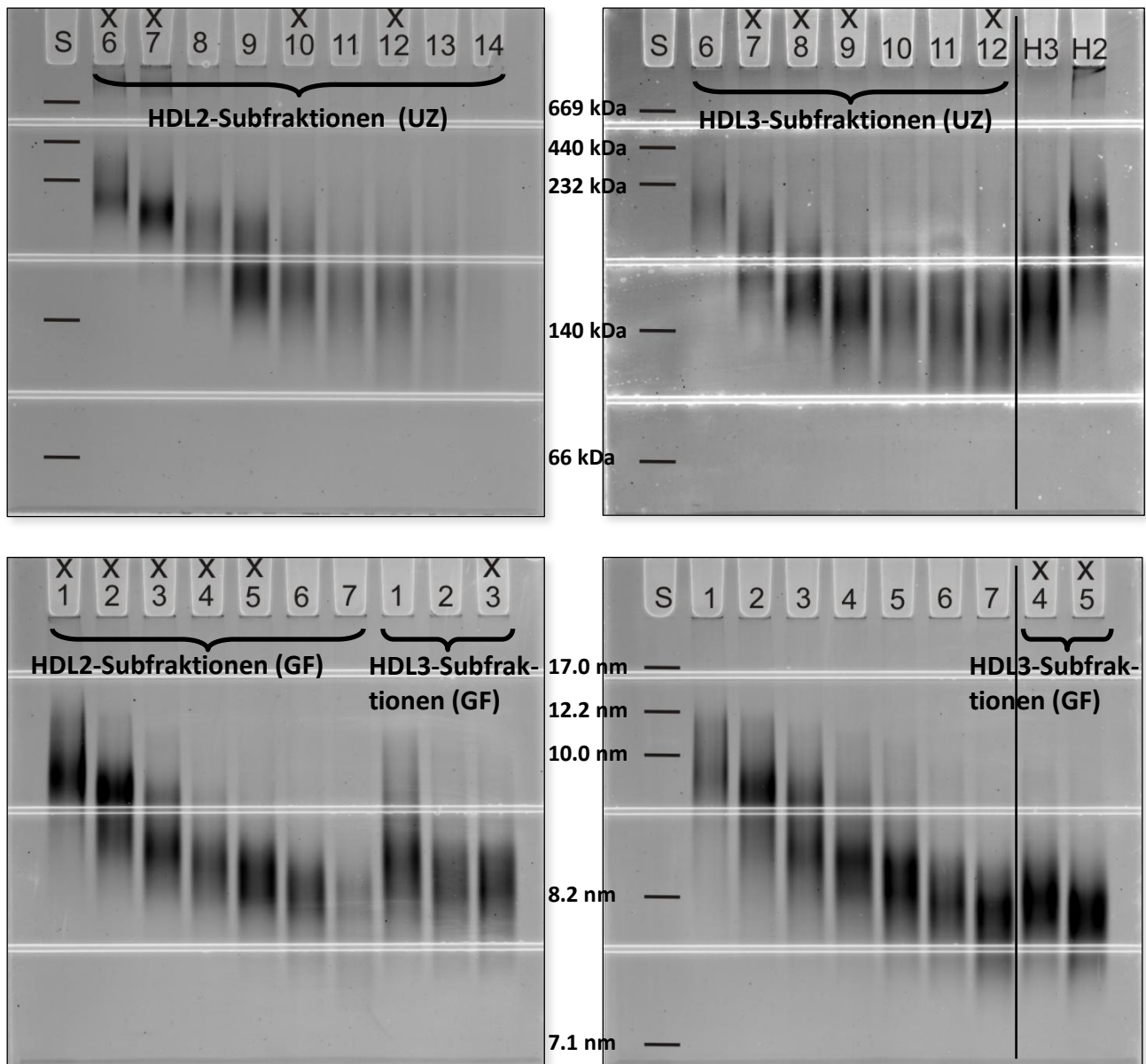
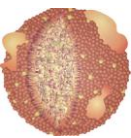


Abb. 4.56: Gelelektrophorese von HDL-Subfraktionen: *HDL2 (H2)* und *HDL3 (H3)*, sowie daraus separierte HDL-Subfraktionen auf 4-12% Bis-Tris Gradientengelen; Subfraktionen aus *Ultrazentrifugation (UZ)* mit Optiprep-Dichtegradient (links: HDL2 (Fraktionen 6-14), rechts: HDL3 (Fraktionen 6-12) und Gesamt-HDL3 und -HDL2 als Ausgangsmaterial) (**oben**), Subfraktionen aus *Gelfiltration (GF)* (links: HDL2 (Fraktionen 1-5) und HDL3 (Fraktionen 1-3), rechts: nicht verwendete Subfraktionen aus Trennung von Gesamt-HDL (Fraktionen 1-7) und HDL3 (Fraktionen 4-5); beide Gele liefen parallel, daher wurde nur einmal der Standard aufgetragen) (**unten**), S = Standard (siehe Kapitel 3.4.2, Tab. 3.6); die mit x markierten Subfraktionen wurden für weitere Messungen verwendet



Im Weiteren werden die ausgewählten Proben wie folgt bezeichnet:

Subfraktion aus DG-UZ	Bezeichnung	Subfraktion aus GF	Bezeichnung
HDL2, Subfraktion 6	HDL2-Sub1-UZ	HDL2, Subfraktion 1	HDL2-Sub1-GF
HDL2, Subfraktion 7	HDL2-Sub2-UZ	HDL2, Subfraktion 2	HDL2-Sub2-GF
HDL2, Subfraktion 10	HDL2-Sub3-UZ	HDL2, Subfraktion 3	HDL2-Sub3-GF
HDL2, Subfraktion 12	HDL2-Sub4-UZ	HDL2, Subfraktion 4	HDL2-Sub4-GF
HDL3, Subfraktion 7	HDL3-Sub1-UZ	HDL2, Subfraktion 5	HDL2-Sub5-GF
HDL3, Subfraktion 8	HDL3-Sub2-UZ	HDL3, Subfraktion 3	HDL3-Sub1-GF
HDL3, Subfraktion 9	HDL3-Sub3-UZ	HDL3, Subfraktion 4	HDL3-Sub2-GF
HDL3, Subfraktion 12	HDL3-Sub4-UZ	HDL3, Subfraktion 5	HDL3-Sub3-GF

Bevor die Proben eingehender untersucht wurden, wurden sie soweit verdünnt, dass ihre Absorbanz maximal 0.1 betrug, was im folgenden Kapitel als kurzer Exkurs eingehender diskutiert wird. Die Ergebnisse der Daten befinden sich anschließend in Kapitel 4.4.1.3.

4.4.1.1 EINFLUSS DER KONZENTRATION IN HDL-PROBEN

Die Reinigungsprozedur einzelner Lipoproteinklassen und -subklassen beinhaltet die Konzentration verdünnter Proben, die mit Hilfe spezieller Konzentratoren bewerkstelligt wird. Damit es zu keinen eventuellen Effekten auf Grund zu hoher Konzentrationen in den Lipoproteinen kommt, wurde eine Verdünnungsreihe von Gesamt-HDL erstellt (Tab. 4.29) und die einzelnen Proben entsprechend untersucht.

Verdünnung	Relative Konzentration	Chemische Verschiebung [ppm]			Absorbanz (460 nm)	Graphische Ansicht
konzentriert	1.0000	0.8293	1.2201	3.2075	0.3182	
1:1	0.5000	0.8260	1.2166	3.2033	0.1565	
1:2	0.3333	0.8246	1.2156	3.2023	0.1045	
1:4	0.2000	0.8231	1.2143	3.2009	0.0611	
1:8	0.1111	0.8220	1.2133	3.1999	0.0368	
1:12	0.0769	0.8217	1.2129	3.1994	0.0263	
1:20	0.0476	0.8213	1.2125	3.1994	0.0161	
1:50	0.0196	0.8207	1.2123	3.1989	0.0055	

Tab. 4.29: Verdünnung der Proben ausgehend von konzentriertem Gesamt-HDL, Maxima der NMR-Signale der Cholin-Gruppe bei 3.2 ppm, der CH_2 -Gruppe bei 1.2 ppm und der CH_3 -Gruppe bei 0.8 ppm aus Abb. 4.57 und gemessene Absorbanz bei 460 nm; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH_3 -Gruppen aufgetragen

Da HDL einen relativ hohen Proteingehalt aufweist, konnten Absorptionsmessungen zur Charakterisierung herangezogen werden. Bei 460 nm befand sich ein lokales Absorptionsmaximum. Außerdem wurden 1D-NMR-Spektren (Abb. 4.57), sowie diffusionsgewichtete NMR-Spektren aufgenommen (Abb. 4.58), um die Verschiebung im Magnetfeld und mögliche Aggregationen bei höheren Konzentrationen zu detektieren.

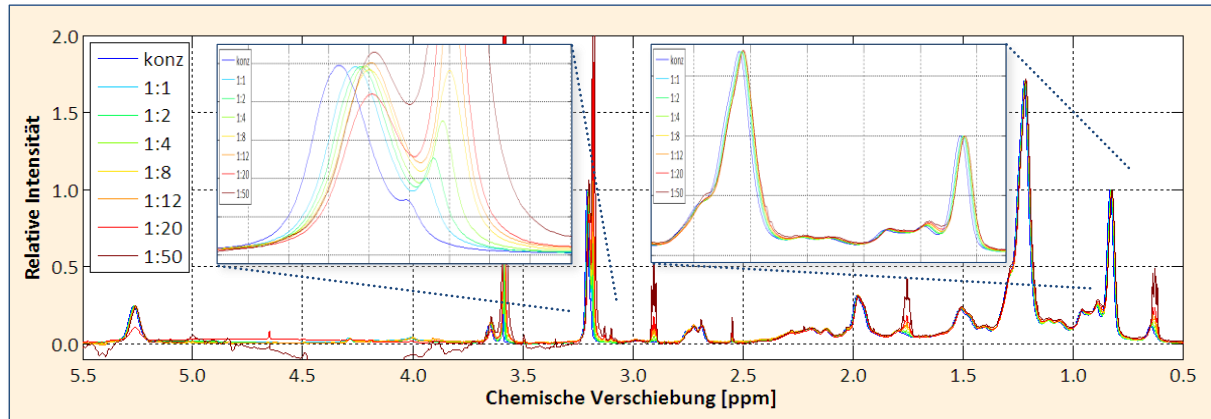


Abb. 4.57: NMR-Spektren von Gesamt-HDL in unterschiedlicher Verdünnung: HDL wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); die Spektren wurden alle auf DSS referenziert; zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Spektren auf 1.0 normiert

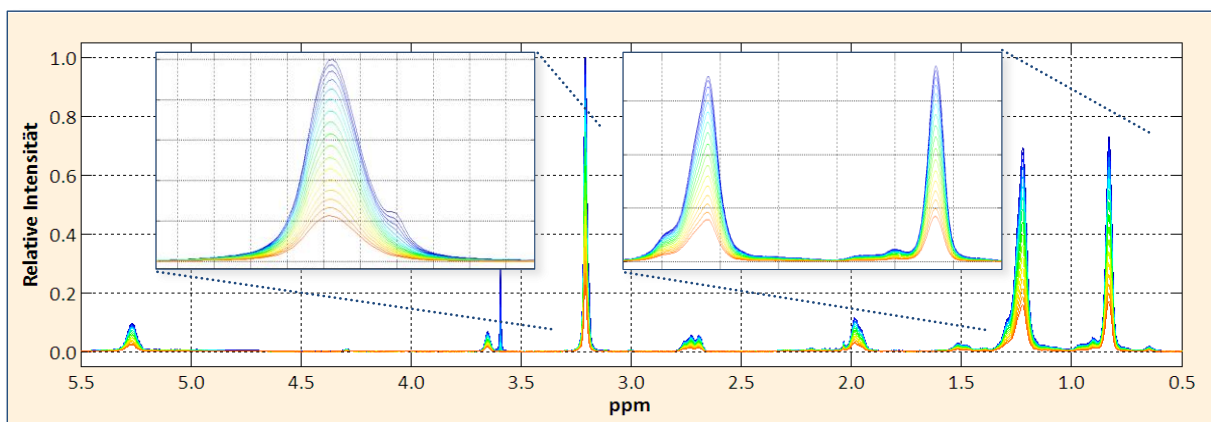
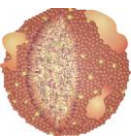


Abb. 4.58: Diffusionsspektren von konzentriertem Gesamt-HDL mit variabler Gradientenstärke von 10% (blau) bis 90% (rot) in 5%-Schritten: HDL wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz ledbgppr2s, einer Diffusionszeit von 100 ms, einem Gradientenpuls von 2 ms bei 310K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurde die Signalhöhe des Cholin- CH_3 -Peakmaximums (3.2 ppm) des ersten Spektrums auf 1.0 normiert; die Form der Signale ändert sich bei den verschiedenen Gradientenstärken nicht



Man kann deutlich erkennen, dass konzentriertere Proben eine Verschiebung der Signalmaxima hin zu höheren Frequenzen aufweisen. Die chemischen Verschiebungen der Signalmaxima der CH_3 - und CH_2 -Gruppen, sowie der Cholin-Kopfgruppe sind für alle drei Signale identisch und macht bis zu 6.8 Hz von der konzentriertesten bis zur verdünntesten Probe aus (Tab. 4.29). Grund dafür könnte eine mögliche Aggregation und somit eine Vergrößerung der Partikel sein³⁵. Die Verschiebung ist allerdings ausgeprägter für höhere Konzentrationen und fällt ab einer Verdünnung von 1:8 und einer entsprechenden Absorbanz von 0.04 kaum noch ins Gewicht. Das Cholin-Kopfgruppen-Signal bei 3.2 ppm wird von einer niedermolekularen Verunreinigung im Puffer überlagert, die mit steigender Verdünnung logischerweise an Signalintensität zunimmt. In den diffusionsgewichteten Spektren ist eben dieses Signal ab einer Gradientenstärke von etwa 50% völlig verschwunden. Da man den Einfluss auf die Berechnung der Diffusionskonstante hier leider nicht vermeiden kann, wird das Signal bei 3.2 ppm für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt.

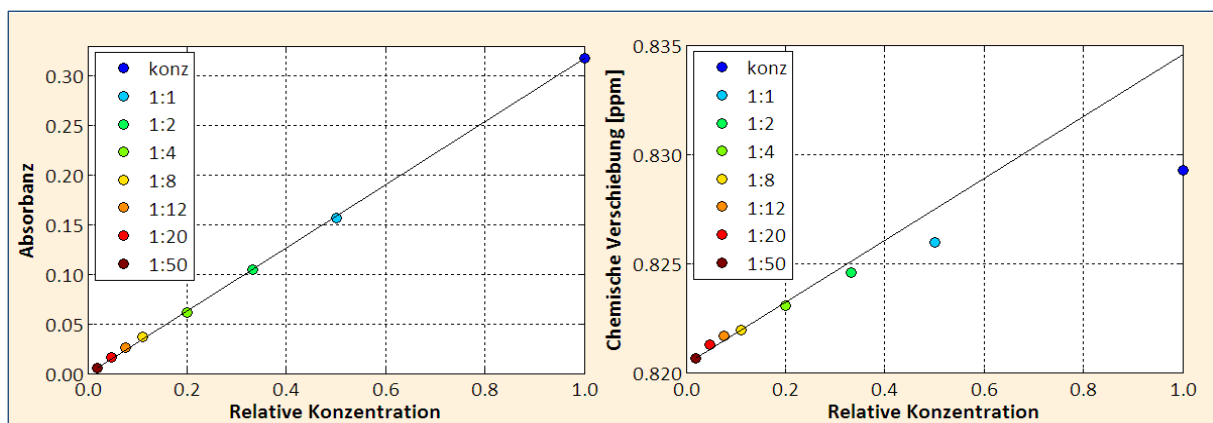


Abb. 4.59: Abhängigkeit der relativen Konzentration der HDL-Proben aus Abb. 4.57 auf deren Absorbanz (links) und chemische Verschiebung der CH_3 -Gruppen im NMR-Spektrum (rechts); für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.57 und Abb. 4.58

Trägt man die Absorbanz gegen die relative Konzentration auf, erhält man eine lineare Abhängigkeit. Im Gegensatz dazu weicht die chemische Verschiebung hoch konzentrierter Partikel von der Linearität ab (Abb. 4.59).

Betrachtet man die Diffusionskoeffizienten der entsprechenden Proben, erkennt man, dass die Beweglichkeit in konzentrierteren Lösungen geringer ist (Tab. 4.30 und Abb. 4.60). Der

Diffusionskoeffizient ist abhängig von der Viskosität der Lösung, was darauf hindeutet, dass die Partikel dichter gepackt und damit in ihrer Bewegung eingeschränkt.

Diffusions- koeffizient [$10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$]	Konz.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:12	1:20	1:50
CH₃	5.59 ± 0.04	5.77 ± 0.02	6.23 ± 0.06	6.11 ± 0.07	6.26 ± 0.09	6.52 ± 0.03	6.62 ± 0.05	6.76 ± 0.16
CH₂	5.66 ± 0.03	5.84 ± 0.03	6.32 ± 0.05	6.21 ± 0.08	6.27 ± 0.09	6.57 ± 0.03	6.63 ± 0.06	6.73 ± 0.10
DSS	73.24 ± 1.21	77.92 ± 1.25	80.10 ± 1.33	82.32 ± 0.83	83.36 ± 1.02	81.01 ± 0.31	85.63 ± 0.33	107.94 ± 6.28

Tab. 4.30: Berechnete Diffusionskoeffizienten einer konzentrierten (konz.) HDL-Probe und verschiedener Verdünnungen aus den Signalmaxima der CH₃-Gruppen und CH₂-Gruppen und des in der Lösung enthaltenen DSS (Abb. 4.58); die Diffusionskoeffizienten sind aufgrund der variierenden Spektrometerkonstanten nicht ganz korrekt, sind aber relativ zueinander konsistent und liefern eine gute Abschätzung (siehe Kapitel 3.3.4)

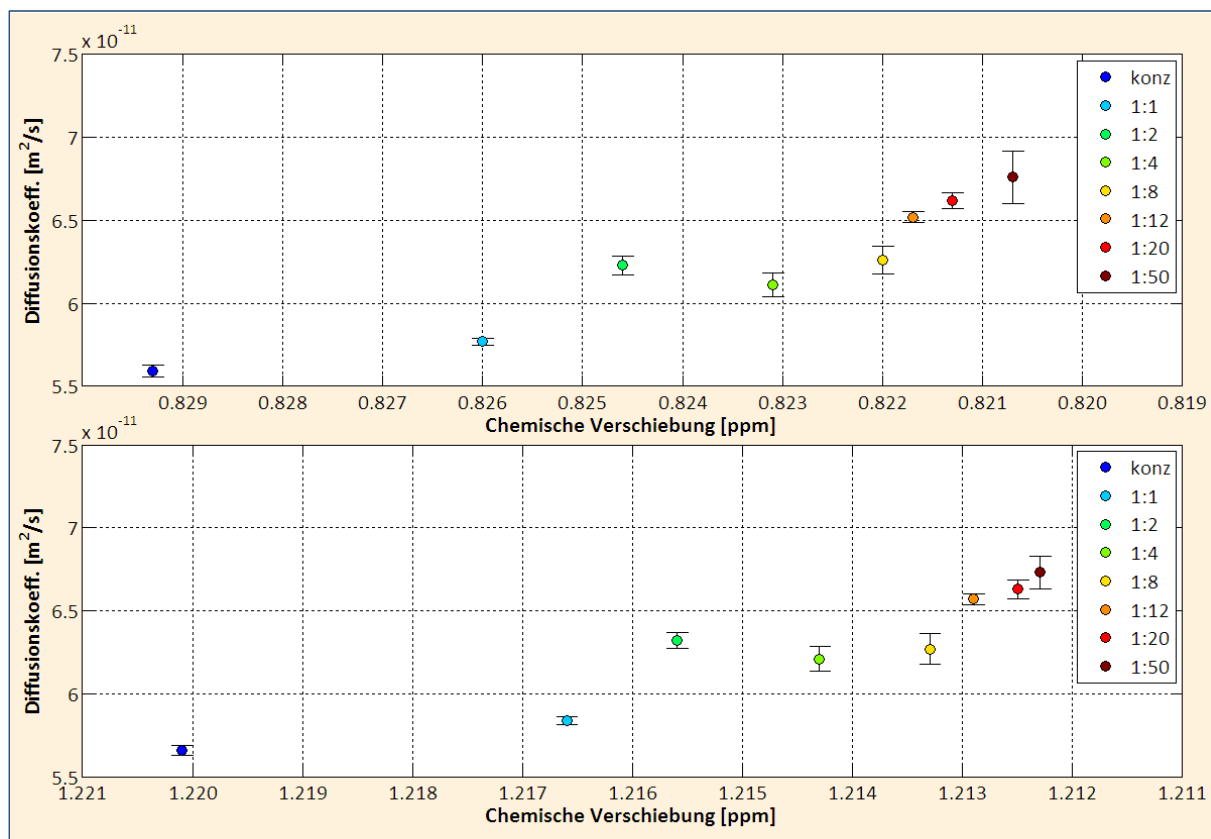
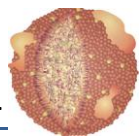


Abb. 4.60: Berechnete Diffusionskoeffizienten einer konzentrierten (konz.) HDL-Probe und verschiedener Verdünnungen aus den Signalmaxima der CH₃-Gruppen (oben) und CH₂-Gruppen (unten) in Korrelation zur jeweiligen Verschiebung im NMR-Spektrum (Tab. 4.30); für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.57 und Abb. 4.58



Ebenso verhält es sich mit dem Diffusionskoeffizienten des DSS in den entsprechenden Proben, der eine geringe Beweglichkeit hin zu höheren Konzentrationen zeigt (Tab. 4.30 und Abb. 4.61).

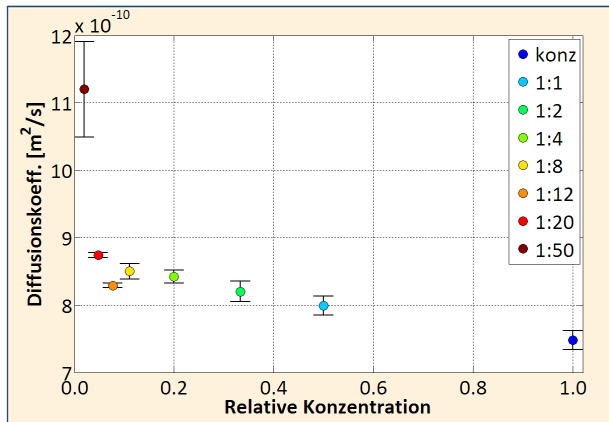


Abb. 4.61: Berechnete Diffusionskoeffizienten für DSS in Lösungen aus Gesamt-HDL in Korrelation zur relativen Konzentration der Proben (Tab. 4.30); für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.57 und Abb. 4.58

Die Gleichung zur Abschätzung der molaren Massen hängt stark vom Diffusionskoeffizienten des DSS ab (siehe Kapitel 3.3.4). So kann man aber eine gewisse Korrektur der Daten vornehmen, da sowohl die HDL-Partikel als auch das DSS von der Viskosität der umgebenden Lösung gleichermaßen beeinflusst werden. (und Abb. 4.62).

Molare Masse [g/mol]	Konz.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:12	1:20	1:50
CH ₃	440624 ± 482910	482910 ± 28381	418174 ± 31990	479322 ± 31576	462757 ± 35788	376937 ± 10293	424694 ± 13668	797714 ± 194900
CH ₂	426237 ± 28108	465716 ± 28072	399351 ± 29311	458339 ± 30596	460437 ± 36788	368523 ± 10060	422630 ± 15835	809289 ± 175854

Tab. 4.31: Berechnete molare Massen einer konzentrierten (konz.) HDL-Probe und verschiedener Verdünnungen aus den Signalmaxima der CH₃-Gruppen und CH₂-Gruppen und des in der Lösung enthaltenen DSS aus Tab. 4.30

In Tab. 4.31 sind die berechneten molaren Massen zusammengefasst und in Abb. 4.62 graphisch dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit kann man für Lösungen ab einer Verdünnung von 1:8 keine nennenswerten Unterschiede beobachten. Bei niedrigerer Verdünnung weichen die Ergebnisse ab. Es war hierbei nötig, das schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch eine sechsfach längere Aufnahmezeit zu erhöhen.

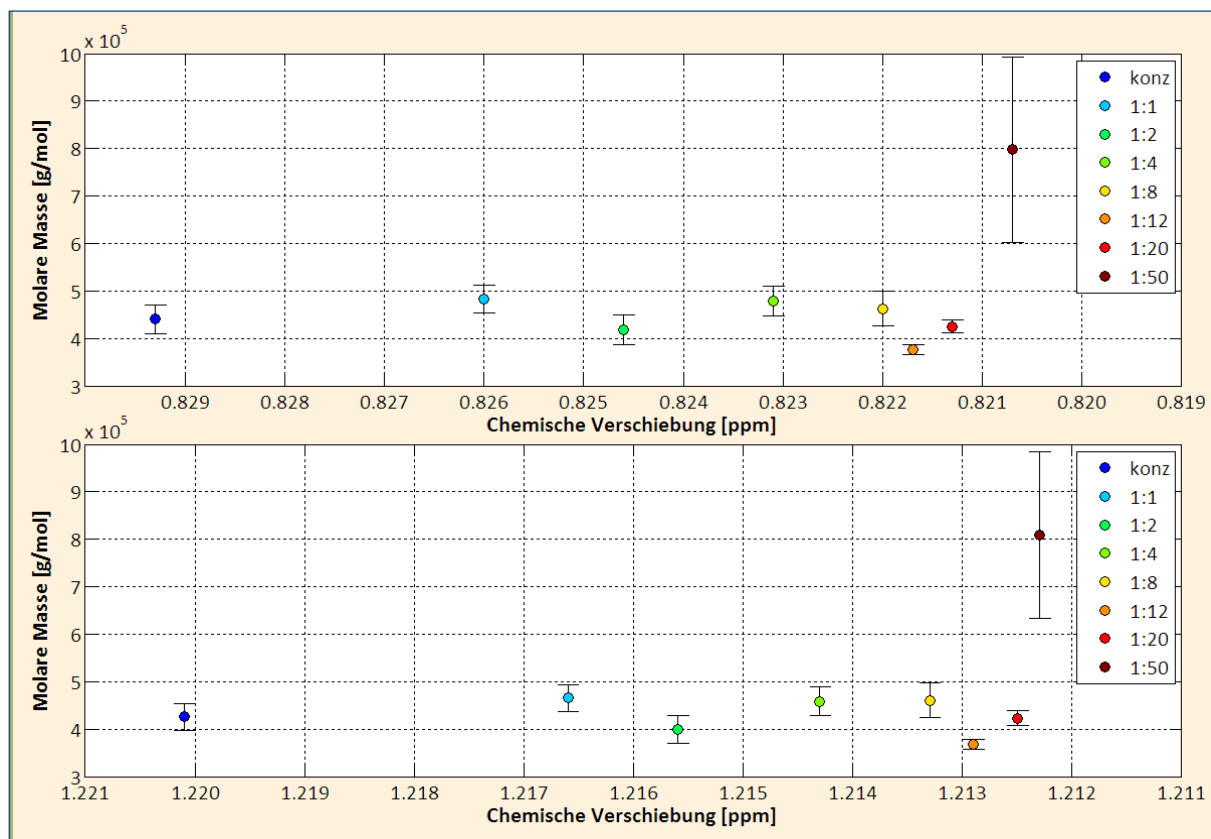
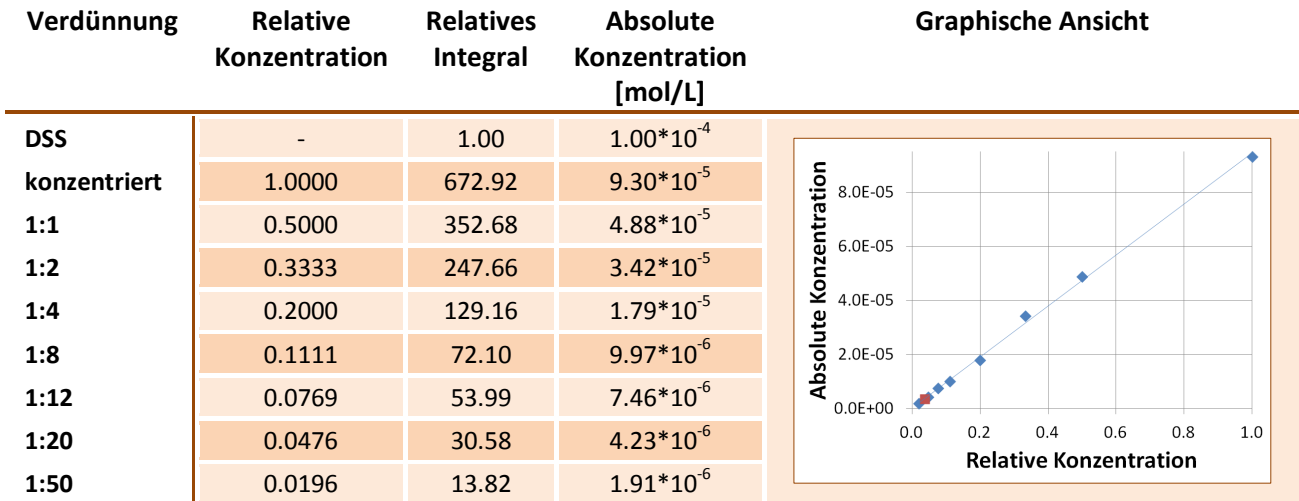
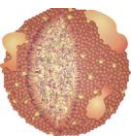


Abb. 4.62: Berechnete molare Massen einer konzentrierten (konz.) HDL-Probe und verschiedener Verdünnungen aus den Signalmaxima der CH₃-Gruppen (oben) und CH₂-Gruppen (unten) in Korrelation zur jeweiligen Verschiebung im NMR-Spektrum (Tab. 4.31); für Details zu Proben und Spektren siehe Abb. 4.57 und Abb. 4.58

Um eine ungefähre Größenordnung abzuschätzen, welche Konzentration von HDL der tatsächlichen in Serum am nächsten kommt, wurden das Integral der HDL-Proben im Bereich von 0.2-3.45 ppm (Lokales Minimum) mit dem von DSS, das immer in bekannter und identischer Konzentration vorlag, verglichen. Für die konzentrierteste HDL-Probe wurde zudem das gesamte Integral des Spektrums zu 781.12 bestimmt, woraus sich ergibt, dass der verwendete Integralbereich etwa 86% ausmacht. Der Fehler durch das restliche Wasser war hierbei minimal. In Anlehnung an die Berechnung in Kapitel 4.1.6 wurden die Daten mit der mittleren molaren Masse und Konzentration von HDL und der entsprechenden Sichtbarkeit korrigiert. Außerdem wurde davon ausgegangen, dass der Proteinanteil 50% beträgt. So konnte die absolute Konzentration der Proben kalkuliert werden. Die 1:20 und 1:50 Verdünnungen lagen letztendlich am nächsten an der tatsächlich in Serum vorliegenden Konzentration. Eine Zusammenstellung der Daten befindet sich in Tab. 4.32.



Tab. 4.32: Abschätzung der absoluten Konzentration der HDL-Proben in verschiedener Verdünnung: zur Berechnung wurden die Daten aus Kapitel 4.1.6 herangezogen; das Integral der HDL-Proben wurde im Bereich von 0.2 – 3.45 ppm bestimmt; Gesamtintegral von HDL in der konzentrierten Probe = 781.12 (verwendetes Integral entspricht 86% und musste entsprechend nach oben korrigiert werden); $c(\text{HDL}) = 3.517 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ (roter Punkt); $M(\text{HDL}) = 137381 \text{ g/mol}$; $c(\text{DSS}) = 1 \cdot 10^{-4}$; $M(\text{DSS}) = 196,34 \text{ g/mol}$; Sichtbarkeit der Lipide im Spektrum = 60%; Proteinanteil in HDL = 50%; die Daten stammen aus der Berechnung in Kapitel 4.1.6

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten, dass eine übermäßige Konzentration der Proben zu einer unerwünschten Verschiebung der Signalmaxima in den NMR-Spektren führt, was auf eine dichtere Packung der Partikel schließen lässt. Da die Messung verdünnter Proben deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt, um ein adäquates Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wird für HDL eine Absorbanz von 0.1 als akzeptabler Kompromiss zwischen Messdauer und Signalpräzision angesehen.

4.4.1.2 EINFLUSS DES pH-WERTES IN HDL-PROBEN

Der pH-Wert kann abhängig von der Genauigkeit der Arbeitsweise und Messgeräte gewissen Schwankungen unterliegen. Um den Einfluss des pH-Wertes innerhalb physiologischer Grenzen zu untersuchen, wurde Gesamt-HDL bei einem pH-Wert von 6.0 bis 8.0 in Abstufungen von 0.2 pH-Einheiten gemessen (Abb. 4.63).

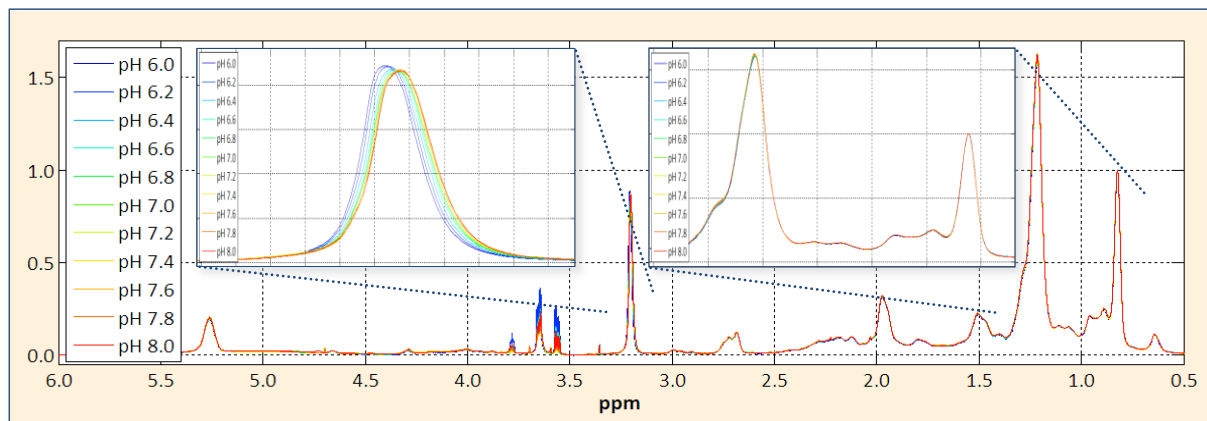


Abb. 4.63: NMR-Spektren von Gesamt-HDL bei unterschiedlichen pH-Werten: HDL wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); die Spektren wurden alle auf DSS referenziert; zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Spektren auf 1.0 normiert

Die Spektren weisen im gesamten Frequenzbereich keinerlei Veränderungen auf, mit Ausnahme des Cholin-Signals bei 3.2 ppm. Hier kann man eine Hochfeldverschiebung zu hohem pH-Wert hin detektieren, die im Ganzen etwa 3.5 Hz ausmacht (Abb. 4.64). In der Nähe des physiologischen pH-Wertes von 7.4 ist diese Frequenzverschiebung allerdings minimal. Vermutlich ist die Phosphatgruppe des Lipid-Rückgrats mit einem pK_a -Wert um 7.2 auf Grund ihrer räumlichen Nähe zur Umgebung besonders anfällig für pH-Schwankungen.

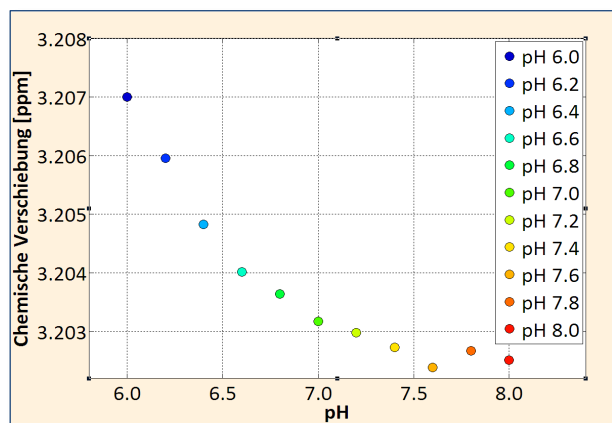
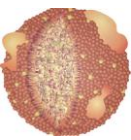


Abb. 4.64: Abhängigkeit der Signalmaxima der Cholin-Kopfgruppensignale in HDL vom pH-Wert der Probe aus Abb. 4.63

4.4.1.3 NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON HDL-SUBFRAKTIONEN

Die zu Beginn des Kapitels separierten HDL-Subfraktionen wurden nun eingehender untersucht. Die NMR-Spektren des Ausgangsmaterials HDL2 und HDL3 sind in Abb. 4.65 dargestellt. Sie unterscheiden



sich nur geringfügig. Sowohl Signalintensität als auch Kurvenform sind sehr ähnlich. Allerdings erkennt man eine leichte Verschiebung bezüglich der x-Achse. HDL2 ist im Vergleich zu dem kleineren HDL3 etwas tieffeldverschoben. Lounila et al. haben 1994 dieses Phänomen untersucht und eine Formel zur Berechnung der Frequenzabhängigkeit von der Partikelgröße aufgestellt³⁵. Somit sind größere Partikel kontinuierlich hin zu höheren Frequenzen hin verschoben.

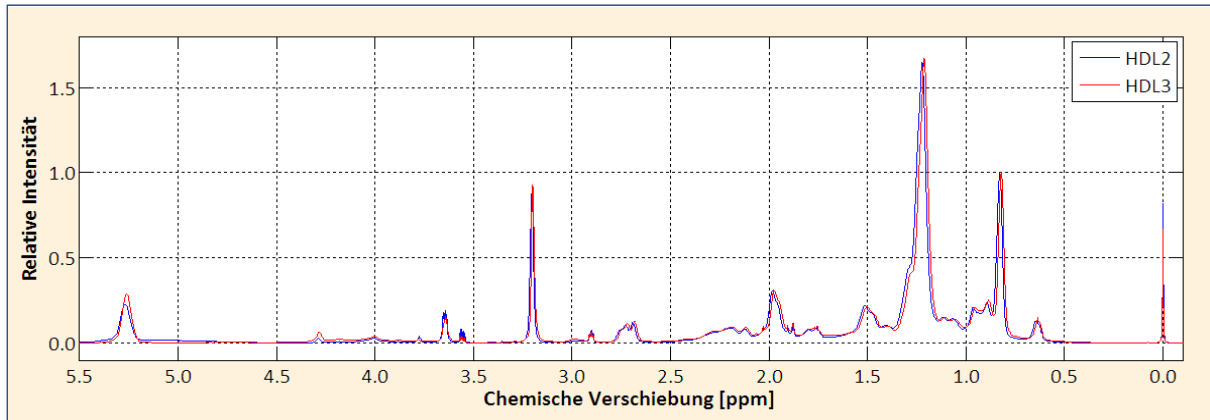


Abb. 4.65: NMR-Spektren von reinem HDL2 und HDL3: die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Spektren auf 1.0 normiert

Im Folgenden wird exemplarisch das Signal der CH_3 -Gruppen (0.8 ppm) der Subfraktionen betrachtet (Abb. 4.66). Andere dominierende Signale wie das der CH_2 -Gruppen (1.2 ppm) oder das der Cholin-Kopfgruppen (3.2 ppm) zeigen ein ähnliches Verhalten (Tab. 4.33). Für die Subfraktionen, die mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation getrennt wurden, kann man eine deutliche Größenverschiebung erkennen, die bei HDL2- und HDL3-Subfraktionen sogar zu einer Überlappung führt. Die nach Größe getrennten Subklassen variieren deutlich geringer, aber ebenso kontinuierlich.

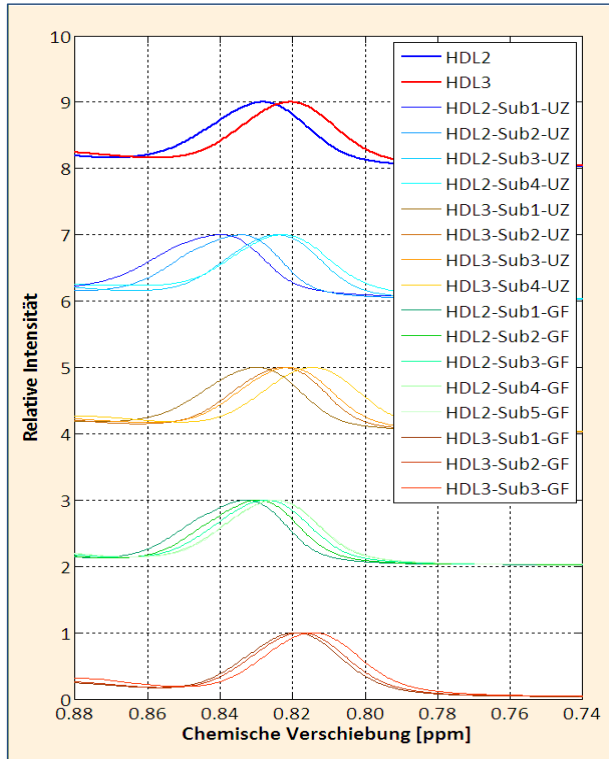
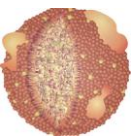


Abb. 4.66: NMR-Spektren von reinem HDL2 und HDL3 nach sequentieller Ultrazentrifugation (oben), sowie daraus erhaltene HDL2- und HDL3-Subfraktionen nach Trennung durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (UZ) oder Gelfiltration (GF): die Spektren wurden alle auf DSS referenziert; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH₃-Peakmaxima aller Spektren auf 1.0 normiert

Lipoprotein-Subklassen	Chemische Verschiebung [ppm] (CH ₃)	Chemische Verschiebung [ppm] (CH ₂)	Chemische Verschiebung [ppm] (Cholin)	Graphische Ansicht
HDL2	0.8283	1.2222	3.2033	
HDL3	0.8206	1.2122	3.2008	
HDL2-Sub1-UZ	0.8396	1.2411	3.2137	
HDL2-Sub2-UZ	0.8338	1.2321	3.2107	
HDL2-Sub3-UZ	0.8245	1.2167	3.2014	
HDL2-Sub4-UZ	0.8227	1.2162	3.2004	
HDL3-Sub1-UZ	0.8296	1.2253	3.2054	
HDL3-Sub2-UZ	0.8229	1.2151	3.2008	
HDL3-Sub3-UZ	0.8212	1.2135	3.2010	
HDL3-Sub4-UZ	0.8148	1.2052	3.1961	
HDL2-Sub1-GF	0.8329	1.2290	3.2101	
HDL2-Sub2-GF	0.8300	1.2249	3.2079	
HDL2-Sub3-GF	0.8275	1.2210	3.2047	
HDL2-Sub4-GF	0.8252	1.2178	3.2036	
HDL2-Sub5-GF	0.8248	1.2171	3.2041	
HDL3-Sub1-GF	0.8194	1.2118	3.2023	
HDL3-Sub2-GF	0.8179	1.2098	3.2013	
HDL3-Sub3-GF	0.8146	1.2055	3.1996	



Tab. 4.33: Chemische Verschiebungen der Maxima einiger aussagekräftiger NMR-Signale der fraktionierten HDL-Subklassen aus Abb. 4.66; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH_3 -Gruppen aufgetragen

Um die Größenverteilungen detaillierter zu untersuchen, wurden Diffusionsmessungen aller Subfraktionen durchgeführt.

In Abb. 4.67 sind gradientengewichtete NMR-Spektren vom Ausgangsmaterial HDL2 aufgetragen. Die höchste Signalintensität kann man bei dem Spektrum mit einer Gradientenstärke von 5% erkennen. Sukzessive Erhöhung bis hin zu 90% führt zu einem kontinuierlicher Intensitätsverlust, abhängig von der Größe der Partikel.

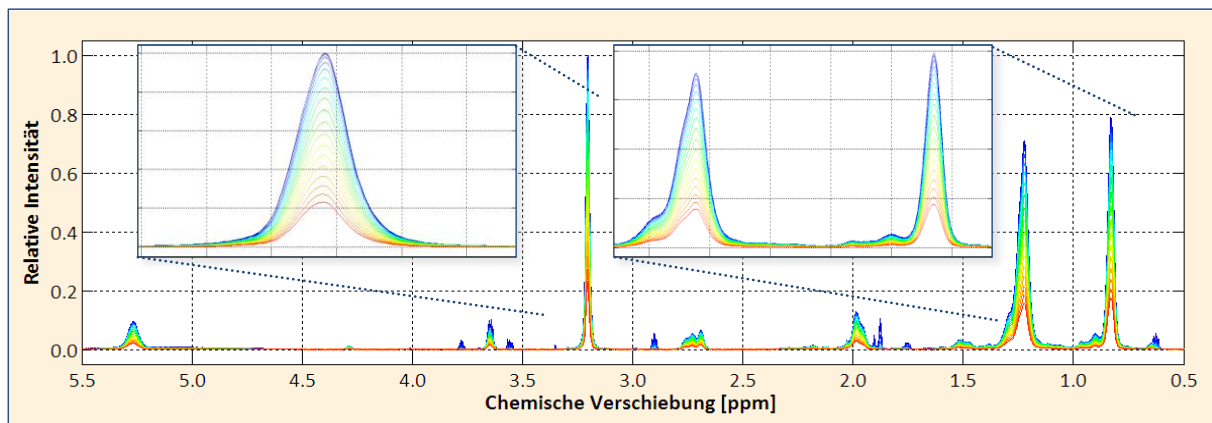
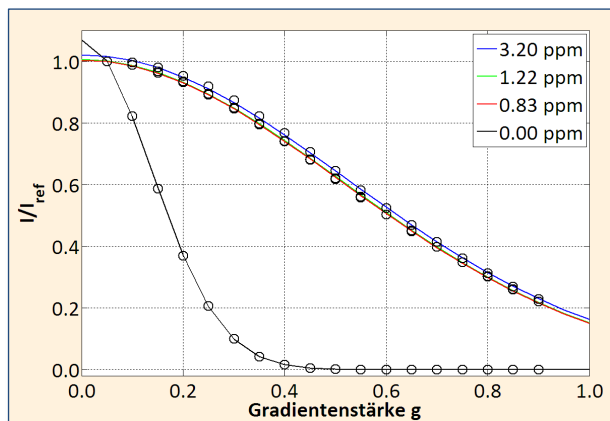


Abb. 4.67: Diffusionsspektren von HDL2 mit variabler Gradientenstärke von 5% (blau) bis 90% (rot) in 5%-Schritten: HDL2 wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz ledbpqpr2s, einer Diffusionszeit von 100 ms und einem Gradientenpuls von 2 ms bei 310 K; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurde die Signalhöhe des Cholin- CH_3 -Peakmaximums (3.2 ppm) des ersten Spektrums auf 1.0 normiert; die Form der Signale ändert sich bei den verschiedenen Gradientenstärken nicht



Berechnete Diffusionskoeffizienten

Cholin: 3.20 ppm: $(5.57 \cdot 10^{-11} \pm 0.08 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

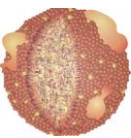
CH₂: 1.22 ppm: $(5.73 \cdot 10^{-11} \pm 0.05 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

CH₃: 0.83 ppm: $(5.75 \cdot 10^{-11} \pm 0.05 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$

DSS: 0.00 ppm: $(8.01 \cdot 10^{-10} \pm 0.03 \cdot 10^{-10}) \text{ m}^2/\text{s}$

Abb. 4.68: Berechnung der Diffusionskoeffizienten von HDL2 und DSS aus Abb. 4.67: aufgetragen wurden die Intensitäten einiger ausgewählter Signale; verwendete Fitfunktion: $I(g) = I_0 \cdot \exp(-c \cdot D \cdot g^2)$; die Diffusionskoeffizienten sind aufgrund der variierenden Spektrometerkonstanten nicht ganz korrekt, sind aber relativ zueinander konsistent und liefern eine gute Abschätzung (siehe Kapitel 3.3.4)

Die Signalintensitäten der CH₃- und CH₂-Gruppen, der Cholin-Kopfgruppe und des in der Lösung enthaltenen DSS wurden zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten herangezogen (Abb. 4.68). Kleinere Moleküle zeigen einen deutlich früheren Abfall der Kurve, da sie schneller diffundieren als größere. So erhielt man für DSS einen Diffusionskoeffizienten von $8.01 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, wohingegen die unterschiedlichen HDL2-Signale relativ ähnliche Diffusionseigenschaften zeigen und mit etwa $5.7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ diffundieren.



Lipoprotein-Subklassen	Diffusionskoeffizient [10 ⁻¹¹ m ² /s] (CH ₃)	Diffusionskoeffizient [10 ⁻¹¹ m ² /s] (CH ₂)	Diffusionskoeffizient [10 ⁻¹¹ m ² /s] (Cholin)	Diffusionskoeffizient [10 ⁻¹¹ m ² /s] (DSS)	Diffusionskoeffizient [10 ⁻¹¹ m ² /s] (HDO)
HDL2	5.75 ± 0.05	5.73 ± 0.05	5.57 ± 0.08	80.07 ± 0.32	331.01 ± 29.51
HDL3	5.89 ± 0.02	5.92 ± 0.02	5.82 ± 0.02	80.46 ± 1.57	331.01 ± 29.51
HDL2-Sub1-UZ	5.53 ± 0.29	5.48 ± 0.25	5.38 ± 0.28	85.39 ± 1.06	224.17 ± 6.52
HDL2-Sub2-UZ	5.54 ± 0.26	5.72 ± 0.31	5.43 ± 0.33	96.10 ± 5.82	257.99 ± 14.90
HDL2-Sub3-UZ	5.96 ± 0.07	6.12 ± 0.07	6.01 ± 0.04	84.29 ± 0.66	257.13 ± 17.80
HDL2-Sub4-UZ	6.45 ± 0.22	6.68 ± 0.31	5.81 ± 0.05	85.37 ± 0.90	235.83 ± 6.59
HDL3-Sub1-UZ	5.60 ± 0.18	5.66 ± 0.17	5.70 ± 0.19	84.94 ± 2.20	266.72 ± 0.10
HDL3-Sub2-UZ	6.61 ± 0.09	6.71 ± 0.10	6.75 ± 0.17	92.31 ± 3.83	235.16 ± 8.59
HDL3-Sub3-UZ	6.40 ± 0.09	6.58 ± 0.13	6.26 ± 0.06	82.60 ± 1.08	244.64 ± 9.45
HDL3-Sub4-UZ	6.41 ± 0.03	6.50 ± 0.04	6.49 ± 0.05	82.38 ± 0.87	252.07 ± 11.57
HDL2-Sub1-GF	4.82 ± 0.05	4.91 ± 0.06	4.80 ± 0.08	83.31 ± 0.94	291.93 ± 27.95
HDL2-Sub2-GF	5.45 ± 0.03	5.47 ± 0.02	5.03 ± 0.13	80.36 ± 0.56	277.76 ± 21.81
HDL2-Sub3-GF	5.50 ± 0.06	5.58 ± 0.07	5.52 ± 0.05	80.15 ± 0.98	282.99 ± 30.75
HDL2-Sub4-GF	6.01 ± 0.12	6.16 ± 0.14	6.21 ± 0.16	78.60 ± 0.55	325.17 ± 41.12
HDL2-Sub5-GF	7.26 ± 0.09	7.40 ± 0.10	7.39 ± 0.08	80.68 ± 1.25	318.92 ± 35.98
HDL3-Sub1-GF	5.99 ± 0.19	6.22 ± 0.24	6.20 ± 0.29	86.54 ± 3.67	341.17 ± 73.63
HDL3-Sub2-GF	6.78 ± 0.22	7.00 ± 0.27	7.04 ± 0.30	79.30 ± 0.95	316.78 ± 28.53
HDL3-Sub3-GF	7.07 ± 0.31	7.41 ± 0.38	7.49 ± 0.42	78.96 ± 0.44	334.27 ± 40.34

Tab. 4.34: Berechnete Diffusionskoeffizienten einiger aussagekräftiger Signale der fraktionierten HDL-Subklassen aus Abb. 4.67, des internen Standards DSS und des D₂O, das vor oder nach Probe unter identischen Bedingungen gemessen wurde; die Diffusionskoeffizienten sind aufgrund der variierenden Spektrometerkonstanten nicht ganz korrekt, sind aber relativ zueinander konsistent und liefern eine gute Abschätzung (siehe Kapitel 3.3.4); der Diffusionskoeffizient von HDO zeigt aus diesem Grund auch Abweichungen vom absoluten Wert ($D_{HDO} = 3.027 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ⁴⁹) auf

In Tab. 4.34 sind alle berechneten Diffusionskoeffizienten der Signale dargestellt. Außerdem wurde vor oder nach jeder Messung der Subfraktionen eine Probe mit D₂O unter denselben Bedingungen gemessen, wobei das Signal nicht aus dem D₂O resultiert, sondern aus HDO durch den restlichen in der Lösung enthaltenen Wasserstoff (Abb. 4.69). Der Diffusionskoeffizient wurde zu etwa $3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt.

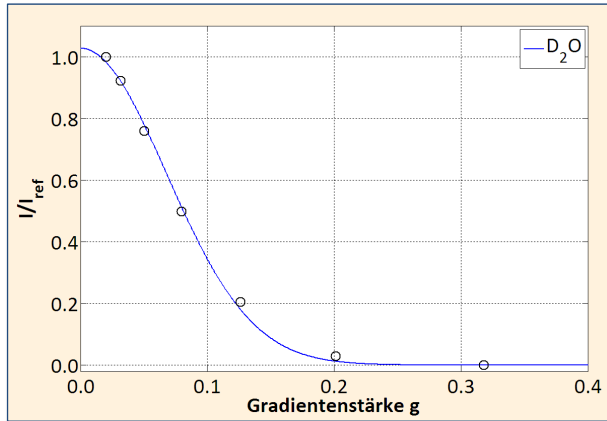


Abb. 4.69: Berechnung des Diffusionskoeffizienten von D_2O : verwendete Fitfunktion: $I(g) = I_0 \exp(-c \cdot D \cdot g^2)$, gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz `ledbgppr2s`, einer Diffusionszeit von 100 ms und einem Gradientenpuls von 2 ms bei 310 K, 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); D_2O wurde jeweils vor einer Probe gemessen und der Diffusionskoeffizient neu bestimmt; der Diffusionskoeffizient ist aufgrund der variierenden Spektrometerkonstanten nicht ganz korrekt, liefert aber eine gute Abschätzung und wird zur weiteren Berechnung benötigt (siehe Kapitel 3.3.4)

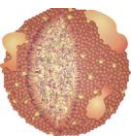
Berechneter Diffusionskoeffizient von D_2O

$$D = (3.31 \cdot 10^{-9} \pm 0.30 \cdot 10^{-9}) \text{ m}^2/\text{s}$$

Lipoprotein-Subklassen	Molare Masse [g/mol]	Hydrodynamischer Radius (HDL) [nm]	Hydrodynamischer Radius (DSS) [nm]	$R_{h,HDL}/R_{h,DSS}$
HDL2	549961 ± 24045	5.20 ± 0.52	0.37 ± 0.03	14.09 ± 2.72
HDL3	504001 ± 34476	5.03 ± 0.47	0.37 ± 0.04	13.69 ± 2.75
HDL2-Sub1-UZ	749243 ± 139553	3.99 ± 0.31	0.26 ± 0.01	15.63 ± 1.80
HDL2-Sub2-UZ	1013245 ± 348273	4.14 ± 0.46	0.24 ± 0.03	17.27 ± 3.97
HDL2-Sub3-UZ	537085 ± 28788	3.81 ± 0.30	0.27 ± 0.02	13.98 ± 2.19
HDL2-Sub4-UZ	495294 ± 56067	3.35 ± 0.19	0.25 ± 0.01	13.56 ± 1.31
HDL3-Sub1-UZ	666626 ± 114175	4.21 ± 0.13	0.28 ± 0.01	15.03 ± 0.87
HDL3-Sub2-UZ	515590 ± 91674	3.14 ± 0.17	0.23 ± 0.02	13.80 ± 1.83
HDL3-Sub3-UZ	420619 ± 34652	3.41 ± 0.18	0.26 ± 0.01	12.89 ± 1.35
HDL3-Sub4-UZ	406398 ± 19940	3.48 ± 0.18	0.27 ± 0.02	12.74 ± 1.38
HDL2-Sub1-GF	999086 ± 74412	5.38 ± 0.59	0.31 ± 0.03	17.20 ± 3.72
HDL2-Sub2-GF	684506 ± 40457	4.67 ± 0.42	0.31 ± 0.03	15.14 ± 2.66
HDL2-Sub3-GF	596953 ± 40442	4.57 ± 0.54	0.32 ± 0.04	14.49 ± 3.48
HDL2-Sub4-GF	415371 ± 37197	4.74 ± 0.71	0.37 ± 0.05	12.84 ± 3.63
HDL2-Sub5-GF	259918 ± 21539	3.88 ± 0.48	0.35 ± 0.05	10.98 ± 2.78
HDL3-Sub1-GF	551341 ± 134128	4.97 ± 1.26	0.35 ± 0.09	14.10 ± 7.23
HDL3-Sub2-GF	293516 ± 43883	4.07 ± 0.52	0.36 ± 0.04	11.43 ± 2.63
HDL3-Sub3-GF	246702 ± 41232	4.08 ± 0.70	0.38 ± 0.05	10.78 ± 3.21

Tab. 4.35: Berechnete molare Massen und hydrodynamische Radien (R_h) der fraktionierten HDL-Subklassen und des DSS, sowie deren Verhältnis: für die Berechnung wurden die Mittelwerte der Diffusionskoeffizienten aus Tab. 4.34 verwendet

Wie in Kapitel 4.4.1.1 gezeigt wurde, hängt die Beweglichkeit von DSS stark von der Konzentration der Probe ab. Da aber alle Subfraktionen auf dieselbe Absorption von 0.1 eingestellt wurden und somit in etwa dieselbe Konzentration aufweisen sollten, konnte über den Vergleich zum Diffusionskoeffizienten des DSS die molare Masse der Proben abgeschätzt werden, und mit Hilfe des



Diffusionskoeffizienten des D_2O die hydrodynamischen Radien (siehe Kapitel 3.3.4). Die Ergebnisse sind in Tab. 4.35 zusammengestellt und in Abb. 4.70 und Abb. 4.71 graphisch dargestellt.

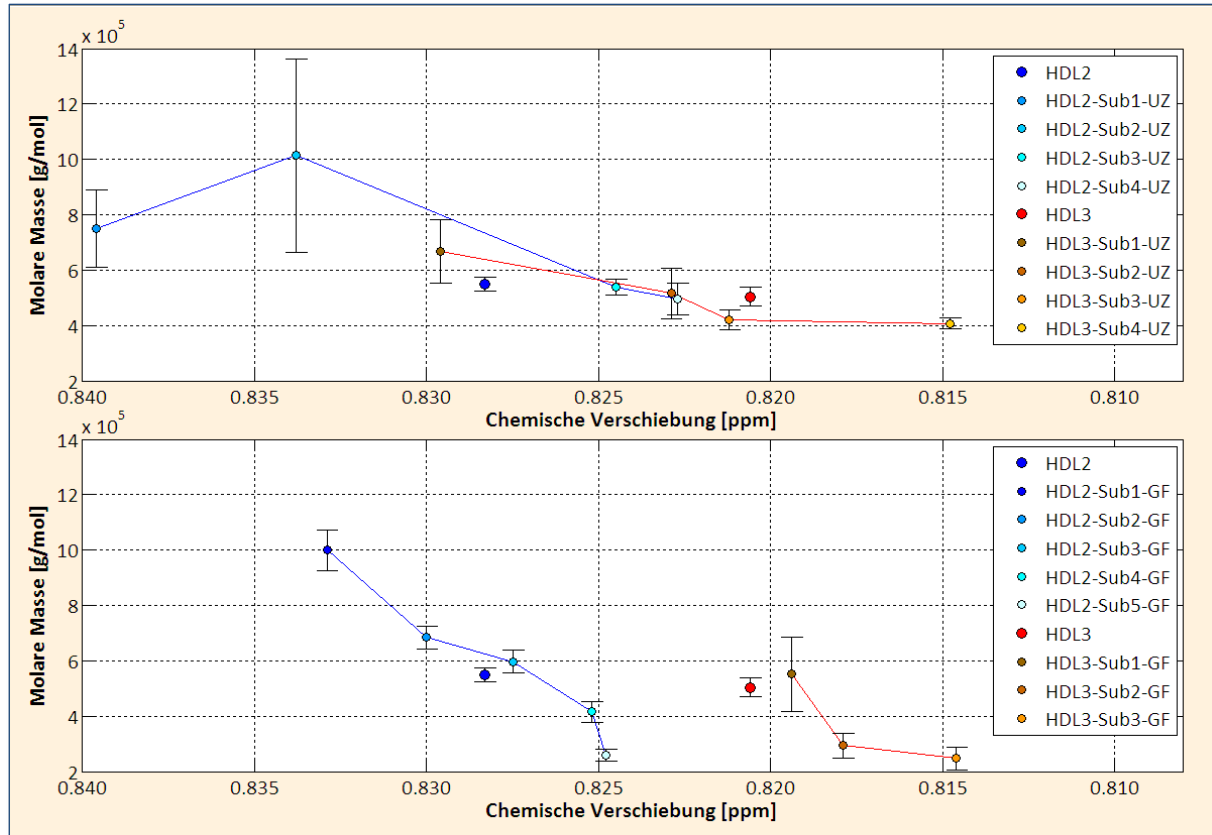


Abb. 4.70: Berechnete molare Massen der getrennten HDL-Subfraktionen nach Ultrazentrifugation (UZ, oben) oder Gelfiltration (GF, unten) aus den Signalmaxima der CH_3 -Gruppen in Korrelation zur jeweiligen Verschiebung im NMR-Spektrum aus Tab. 4.35

Die Massen der HDL-Partikel variieren von etwa 250 kDa bis 1000 kDa, wobei die ursprünglichen Proben HDL2 und HDL3 mit einer relativ ähnlichen Masse von 500 kDa gefunden wurden. Wie erwartet waren schwerere Partikel hin zu höheren Frequenzen verschoben. Beide Trennmethoden lieferten ähnliche Massen, allerdings wurde bei Proben, die mittels Gelfiltration getrennt wurden, auch deutlich leichtere Partikel gefunden.

Die Massen, die mit Hilfe der Gelelektrophorese bestimmt wurden (Abb. 4.56), waren tendenziell kleiner. Der Gelstandard bestand jedoch aus mehr oder weniger globulären Proteinen, die andere molekularen Eigenschaften aufweisen als Lipoproteine.

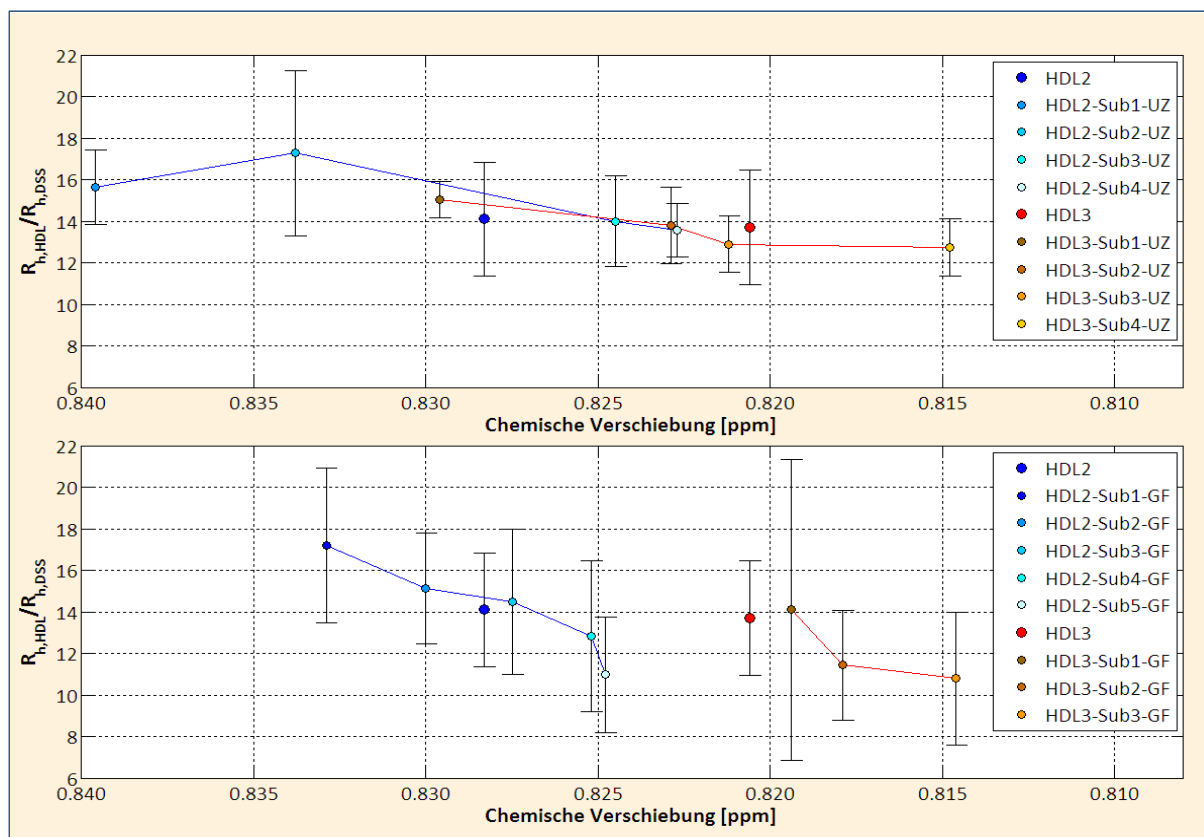
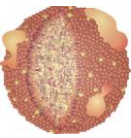


Abb. 4.71: Berechnetes Verhältnis der hydrodynamischen Radien der getrennten HDL-Subfraktionen gegen den des DSS, zum einen nach Ultrazentrifugation (UZ, oben), zum anderen nach Gelfiltration (GF, unten), aus den Signalmaxima der CH_3 -Gruppen in Korrelation zur jeweiligen Verschiebung im NMR-Spektrum aus Tab. 4.35

Um auch für den hydrodynamischen Radius eine Korrektur mit einem internen Standard durchzuführen, wurden die hydrodynamischen Radien für DSS berechnet. Das Verhältnis der Radien ist in Abb. 4.71 aufgetragen. Es ähnelt sehr dem der molaren Massen. Es wurden mittlere Radien von etwa 3 nm bis 6 nm bestimmt (Tab. 4.35). HDL kommt im Allgemeinen in einer Größenverteilung von 5-12 nm, also mit Radien von 2.5-6 nm, vor¹⁴. Die berechneten Werte sind somit durchaus realistisch.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HDL-Subfraktionen, die mit Hilfe eines Optiprep-Dichtegradienten über Ultrazentrifugation separiert wurden, und solche, die mit einer Superdex 200-Gelfiltrationssäule getrennt wurden, keine einheitlichen Ergebnisse in der NMR liefern. Während die Gelfiltration eine differenzierte Größenverteilung wiedergibt, kann man dies bei der Ultrazentrifugation nur in geringerem Maß erkennen (Abb. 4.70). Letztere scheinen hingegen auf die chemische Verschiebung einen deutlich größeren Einfluss auszuüben als die Subfraktionen aus der Gelfiltration (Abb. 4.66).



4.4.2 SUBFRAKTIONIERUNG VON SERUM

Um Lipoproteine aus Serum oder Plasma zu isolieren, wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Klassisch bediente man sich der sequentiellen Ultrazentrifugation, bei der mehrere Trennschritte nötig sind, die aber eine sehr gute Trennleistung besitzt⁹. Des Weiteren wurden Dichtegradienten aus verschiedenen Salzen wie KBr oder NaBr oder aus Sucrose oder Iodixanol-Verbindungen verwendet, um die wichtigsten Lipoproteinklassen in nur einem Schritt zu isolieren^{39, 91-95}. Es wurden auch Methoden vorgestellt, wie Lipoproteine mittels Gelfiltration isoliert werden konnten, wobei häufig die Serumproteine vorher entfernt wurden^{90, 96-99}.

In diesem Kapitel werden zwei präparative Methoden diskutiert, mit denen Serum zeitsparend in nur einem Trennschritt separiert wurde. Die einzelnen Subfraktionen wurden mit Hilfe der NMR untersucht, um die Effektivität der Methode zu erfassen.

4.4.2.1 DICHTEGradienten-ULTRAZENTRIFUGATION IN EINEM SCHRITT

In Kapitel 4.1.1 wurde Serum mittels sequentieller Ultrazentrifugation in die bekannten Klassen VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3, sowie zwei Fraktionen aus Serumproteinen (LPDS) getrennt. Eine vergrößerte Abbildung ist nochmals in Abb. 4.72 dargestellt.

Man sieht, dass die CH₃-Gruppen aller Fraktionen eine mehr oder weniger gauß'sche Kurvenform zeigen. Zudem zeigt das CH₂-Signal ein einzelnes Maximum und zu höheren Frequenzen hin zwei kleinere Schultern.

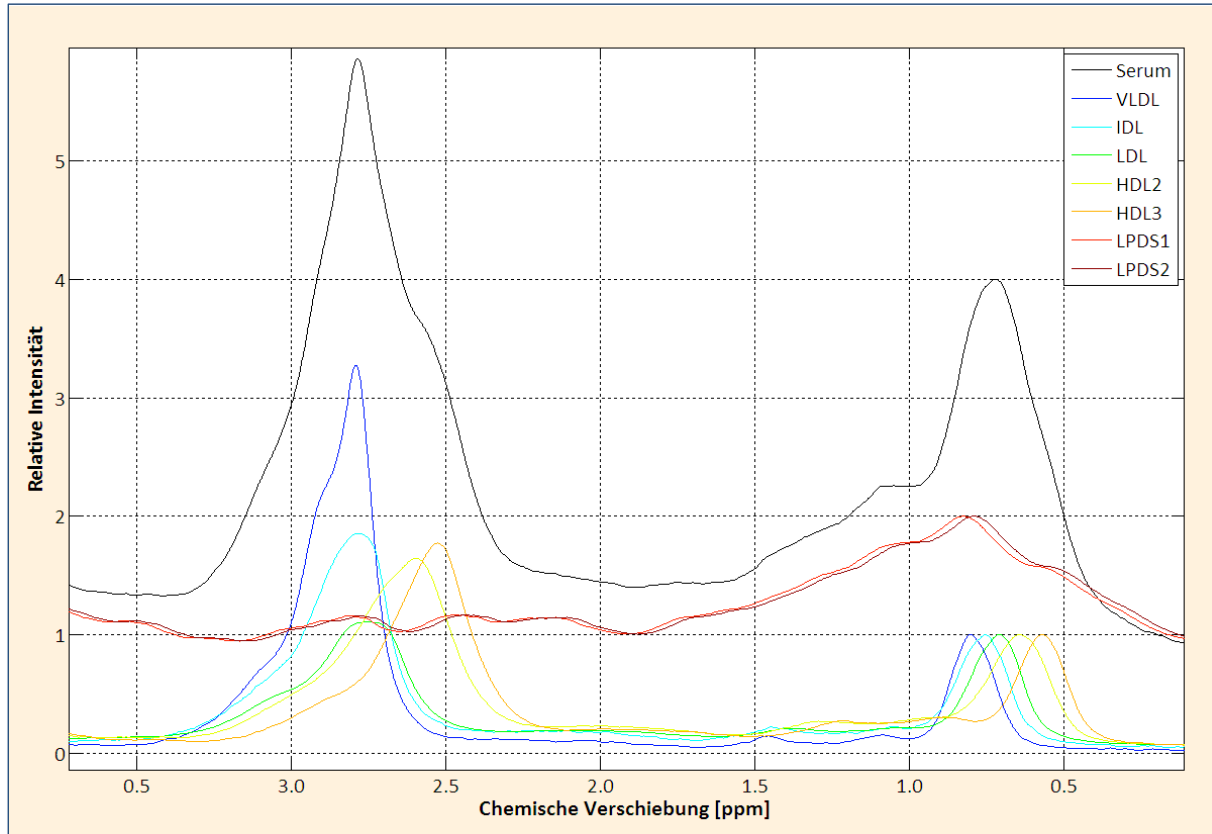


Abb. 4.72: NMR-Spektren von Serum, Lipoproteinfraktionen (VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3) und Proteinfractionen (LPDS1 und LPDS2) aus Kapitel 4.1.1 (Abb. 4.4): die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert; gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Lipoproteinspektren auf 1.0 normiert, die der Proteine auf 2.0 und des Serumspektrums auf 4.0

Alternativ wurde nun Serum über einen NaCl/KBr-Dichtegradienten nach einer abgewandelten Methode von Chapman et al. in einem Ausschwingrotor in einem einzigen Schritt separiert³⁹ (siehe Kapitel 3.2.2).

Schon optisch konnte man die Fraktionen erkennen, in welchen sich Ansammlungen von Lipoproteinen befanden (Abb. 4.73).

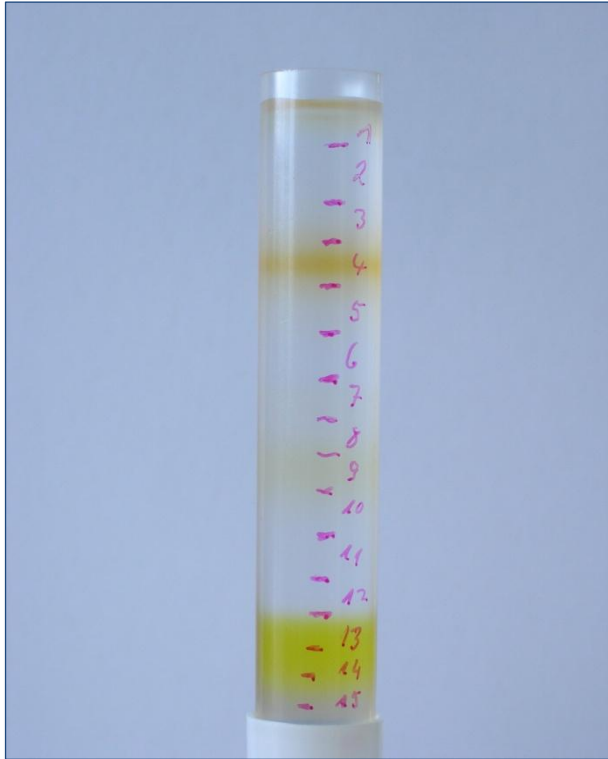
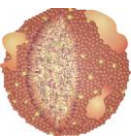


Abb. 4.73: Serumsbfraktionen nach Separation über Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in einem Polyallomer Röhrchen: die Trennung erfolgte in einem SW 41 Ti bei 15 °C bei 40000 rpm; nach beendeter Zentrifugation wurden 15 Fraktionen mit einer Pipette von oben abgetragen.

Die NMR-Spektren der Subfraktionen sind in Abb. 4.74 abgebildet. Die Signalmaxima der CH₃-Signale sind kontinuierlich bezüglich der x-Achse verschoben, was auf eine Größenseparation schließen lässt, aber man sieht sofort, dass die Linienform gerade bei den größeren, beziehungsweise weniger dichten, Partikeln nicht ganz einer Gaußfunktion gleicht, was darauf hindeutet, dass die separierten Subfraktionen nicht so einheitlich sind wie solche, die mit sequentieller Ultrazentrifugation getrennt wurden. Partikel geringerer Größe erscheinen hingegen eine höhere Reinheit aufzuweisen und nicht durch Serumproteine überlagert.

Lipoprotein-Klassen	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Chemische Verschiebung der Signalmaxima der CH ₃ -Gruppen aus sequentieller UZ [ppm]	0.8607	0.8508	0.8419	0.8290	0.8142
Chemische Verschiebung der Signalmaxima der CH ₃ -Gruppen aus Dichtegradienten-UZ [ppm]	0.8632 0.8634	0.8559	0.8410 0.8384 0.8381 0.8379 0.8358	0.8330 0.8267 0.8220	0.8180 0.8137 0.8133
Subklassen aus Dichtegradienten-UZ	Sub1 – Sub2	Sub3	Sub4 – Sub8	Sub9 – Sub11	Sub12 – Sub14

Tab. 4.36: Ungefähre Einteilung der Subklassen aus Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in einem Schritt verglichen mit den NMR-Daten aus Kapitel 4.1.1 nach sequentieller Ultrazentrifugation (UZ)

In Tab. 4.36 sind die chemischen Verschiebungen der Signalmaxima der CH_3 -Gruppen aufgelistet und mit den jeweiligen Werten nach sequentieller Ultrazentrifugation aus Kapitel 4.1.1 verglichen, um eine ungefähre Zuordnung der Subklassen zu den Lipoproteinklassen zu erhalten. In der eindeutig bestimmbar Proteinfraction (Sub15) findet man eventuell noch Bestandteile der HDL3-Klasse, was sich aber durch die überwiegenden Proteinsignale nicht detektieren lässt.

Die Methode beinhaltet eine erhebliche Zeitersparnis, da nur ein Schritt nötig ist, allerdings muss abgewogen werden, ob die Reinheit speziell der größeren Partikel für die jeweilige Problemstellung ausreicht.

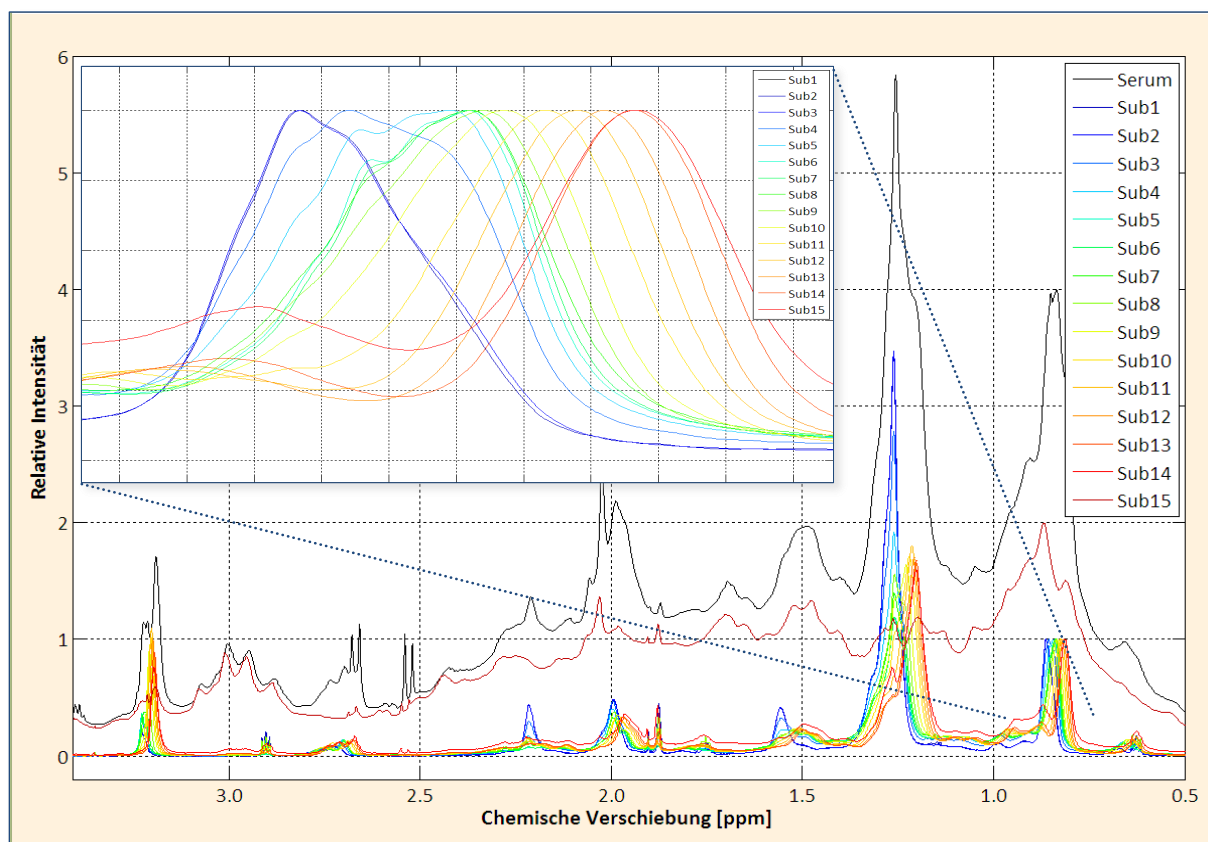
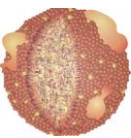


Abb. 4.74: NMR-Spektren von Serum (schwarz) und Serumsbfraktionen (Sub1 – Sub15) aus einer Separation über Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in einem einzigen Schritt: Gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Lipoproteinspektren auf 1.0 normiert, die der Proteine auf 2.0 und des Serumspektrums auf 4.0



4.4.2.2 GELFILTRATION VON GESAMTEM SERUM

Zuletzt wurde versucht, Serum mit Hilfe der Gelfiltration präparativ in Subfraktionen zu zerlegen. Die Trennleistung des üblichen Säulenmaterials zur Gelfiltration ist hierzu nicht ausreichend gut geeignet. Nanjee et al. haben allerdings über eine Aneinanderreihung zweier Säulen gefüllt mit Superdex 200 und Superdex 75 Erfolge in der Isolierung von HDL-Partikeln aus Plasma erzielt⁸⁸. Hier wurde nun noch eine weitere Säule mit Superose 6 in Reihe geschaltet, die besonders zur Reinigung großer Subklassen wie LDL, IDL und VLDL verwendet wird (Abb. 4.75).

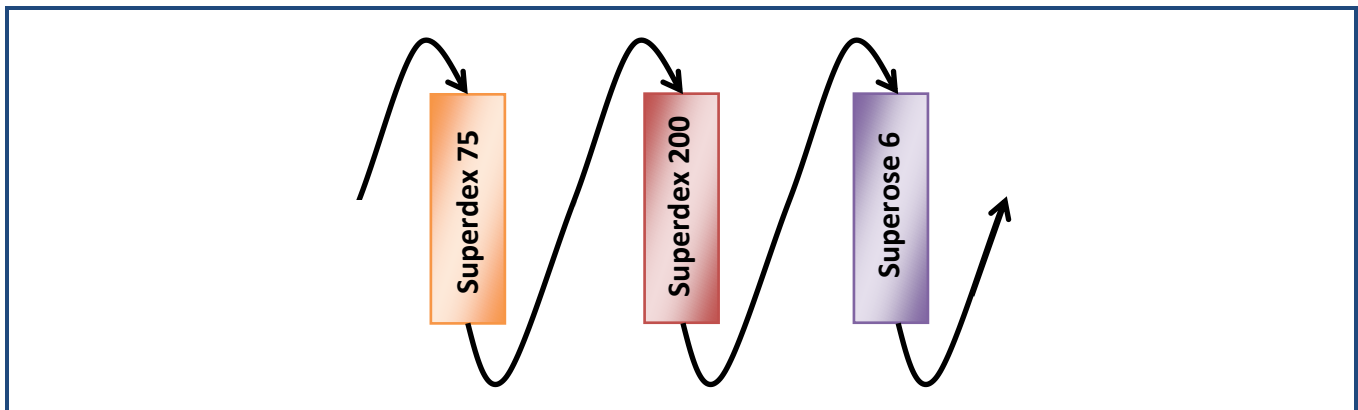


Abb. 4.75: Schematische Darstellung zur Separation von Serumsuklassen direkt aus Serum: Es wurden folgende drei Gelfiltrationssäulen aneinandergereiht: C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 75 prep grade, C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 200 prep grade, C 26/60 Säule gefüllt mit Superose 6 prep grade; getrennt wurde an einem ÄKTA-FPLC-System mit Frac-900-Fraktioniereinheit bei 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit von < 1mL/min (Maximaldruck der Säulen) (siehe Abb. 4.76)

Das Elutionsprofil ist in Abb. 4.76 (oben) dargestellt. Es wurden drei Signale bei etwa 310 mL, 380 mL und 430 mL detektiert, sowie zwei kleine Schultern bei 290 mL und 350 mL. Keins der Signale war soweit isoliert, dass man keinen Überlapp zu den Nachbarsignalen erkennen könnte. Das Signal um 430 mL beinhaltete, wie sich mit der NMR gezeigt hatte, Serumproteine und wurde nicht weiter berücksichtigt.

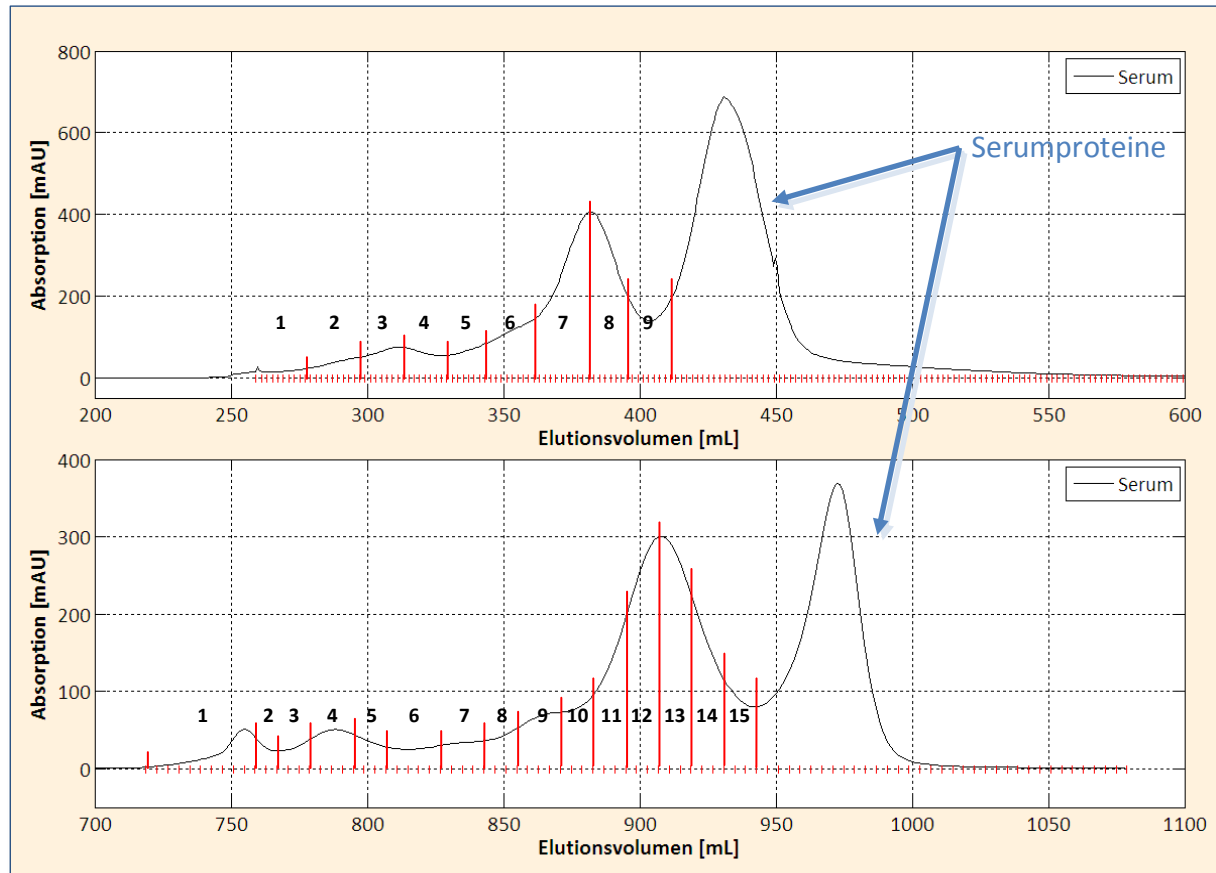
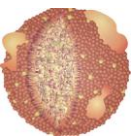


Abb. 4.76: Elutionsprofil von Serum: Die Separation erfolgte an einem ÄKTA-FPLC-System mit Frac-900-Fraktioniereinheit über drei Gelfiltrationssäulen (oben, siehe Abb. 4.75), beziehungsweise fünf Gelfiltrationssäulen (unten, siehe Abb. 4.78), bei 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit < 1 mL/min (Maximaldruck der Säulen); aufgetragen wurden je 2 mL konzentriertes Serum, in Fraktionen von 2 mL geschnitten und zu 9, beziehungsweise 15 Fraktionen vereingigt

Die NMR-Spektren der Subfraktionen sind in Abb. 4.77 zu sehen, eine grobe Einteilung der Subklassen in Lipoproteinklassen in Tab. 4.37.

Lipoprotein-Klassen	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Chemische Verschiebung der Signalmaxima der CH ₃ -Gruppen aus sequentieller UZ [ppm]	0.8607	0.8508	0.8419	0.8290	0.8142
Chemische Verschiebung der Signalmaxima der CH ₃ -Gruppen aus Gelfiltration über drei Säulen [ppm]	0.8650	0.8531 0.8447	0.8453	0.8298 0.8245 0.8204	0.8164 0.8208
Subklassen aus Dichtegradienten-UZ	Sub1	Sub2 – Sub3	Sub4	Sub5 – Sub7	Sub8 – Sub9

Tab. 4.37: Ungefähre Einteilung der Subklassen aus einer Gelfiltrationstrennung über drei Säulen verglichen mit den NMR-Daten aus Kapitel 4.1.1 nach sequentieller Ultrazentrifugation (UZ)



Wie bereits vermutet konnte mit dieser Methode keine saubere Isolation der Lipoproteinklassen erzielt werden. Die großen Partikel zeigen keine gaußverteilten CH_3 -Gruppen-Signale, was auf Verunreinigungen anderer Lipoproteinklassen hindeutet. Die Subfraktionen Sub7-Sub9 sind sogar schon deutlich durch Serumproteine überlagert, was an dem Signalanstieg um 0.87 ppm zu erkennen ist.

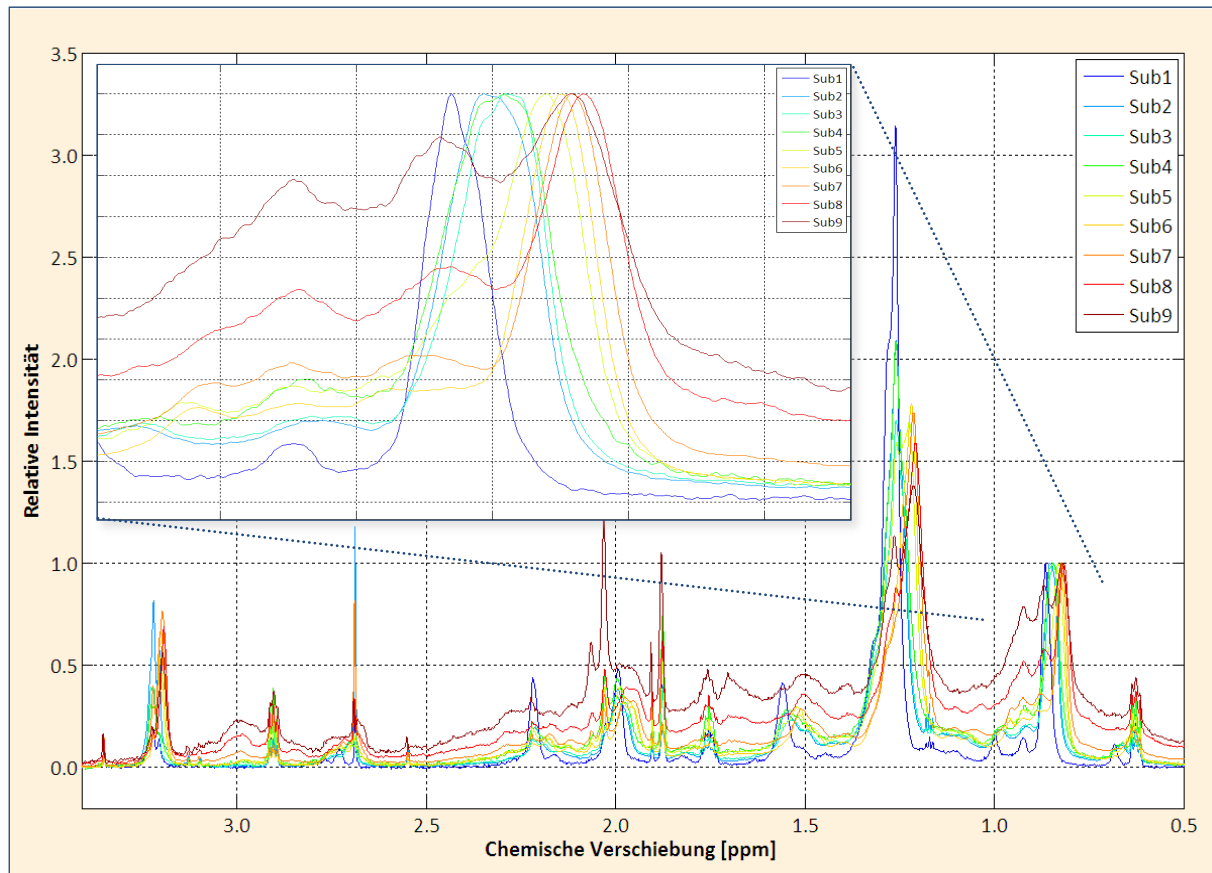


Abb. 4.77: NMR-Spektren von Serumsbfraktionen (Sub1 – Sub9) aus einer Separation über drei in Reihe geschaltete Gelfiltrationssäulen: Gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μL Probe enthielten 100 μM DSS und 5% D_2O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH_3 -Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Spektren auf 1.0 normiert

Es wurde versucht, die Trennleistung noch weiter zu verbessern, indem zusätzlich zu den drei Säulen noch zwei Säulen vorgeschaltet wurden. Gesamtes Serum wurde nun über Superose 6, Superdex 200 und Superdex 75-Säule geleitet. Während sich alle Lipoproteinklassen auf der Säule mit dem Superdex 75 befanden, wurden die beiden ersten Säulen gespült und wieder dahinter in Reihe geschaltet (Abb. 4.78).

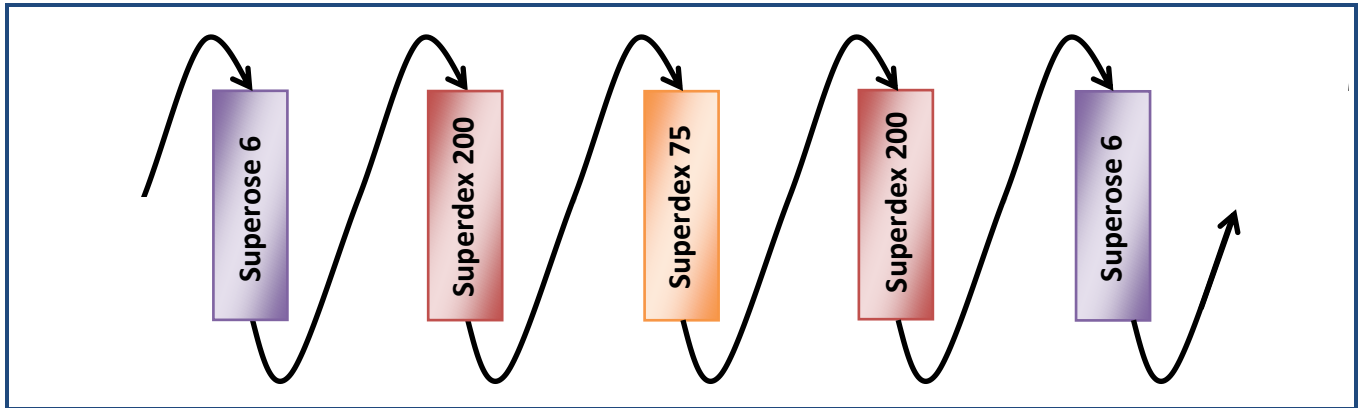


Abb. 4.78: Schematische Darstellung zur Separation von Serumschubklassen direkt aus Serum: Es wurden folgende fünf Gelfiltrationssäulen aneinandergereiht: C 26/60 Säule gefüllt mit Superose 6 prep grade, C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 200 prep grade, C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 75 prep grade, C 16/60 Säule gefüllt mit Superdex 200 prep grade, C 26/60 Säule gefüllt mit Superose 6 prep grade; getrennt wurde an einem ÄKTA-FPLC-System mit Frac-900-Fraktioniereinheit bei 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit von < 1mL/min (Maximaldruck der Säulen) (siehe Abb. 4.76)

Das Elutionsprofil dieser Methode zeigt eine ganz klare Verbesserung der Auftrennung, besonders im Bereich der größeren Partikel (Abb. 4.76, unten). Man kann vier Maxima bei 750 mL, 780 mL, 910 mL und 970 mL erkennen und zusätzlich zwei Schultern bei 830 mL und 860 mL.

Auch die NMR-Spektren bestätigen, dass die Subfraktionen weniger verunreinigt sind (Abb. 4.79). Jedoch scheinen weder VLDL noch IDL als Reinfaktionen in den Proben vorzuliegen (Tab. 4.38). Man kann wiederum für die einzelnen Spektren keine saubere Gaußverteilung der CH₃-Gruppen-Signale erkennen und findet Proteinüberlagerungen bei Partikeln kleiner Größe.

Lipoprotein-Klassen	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Chemische Verschiebung der Signalmaxima der CH ₃ -Gruppen aus sequentieller UZ [ppm]	0.8607	0.8508	0.8419	0.8290	0.8142
Chemische Verschiebung der Signalmaxima der CH ₃ -Gruppen aus Gelfiltration über drei Säulen [ppm]			0.8499	0.8366	0.8153 0.8130 0.8087
			0.8448	0.8327	
			0.8419	0.8316	
			0.8427	0.8284	
			0.8418	0.8242	
Subklassen aus Dichtegradienten-UZ			0.8413	0.8206	
			Sub1 – Sub6	Sub7 – Sub12	Sub13 – Sub15

Tab. 4.38: Ungefähre Einteilung der Subklassen aus einer Gelfiltrationstrennung über fünf Säulen verglichen mit den NMR-Daten aus Kapitel 4.1.1 nach sequentieller Ultrazentrifugation (UZ)

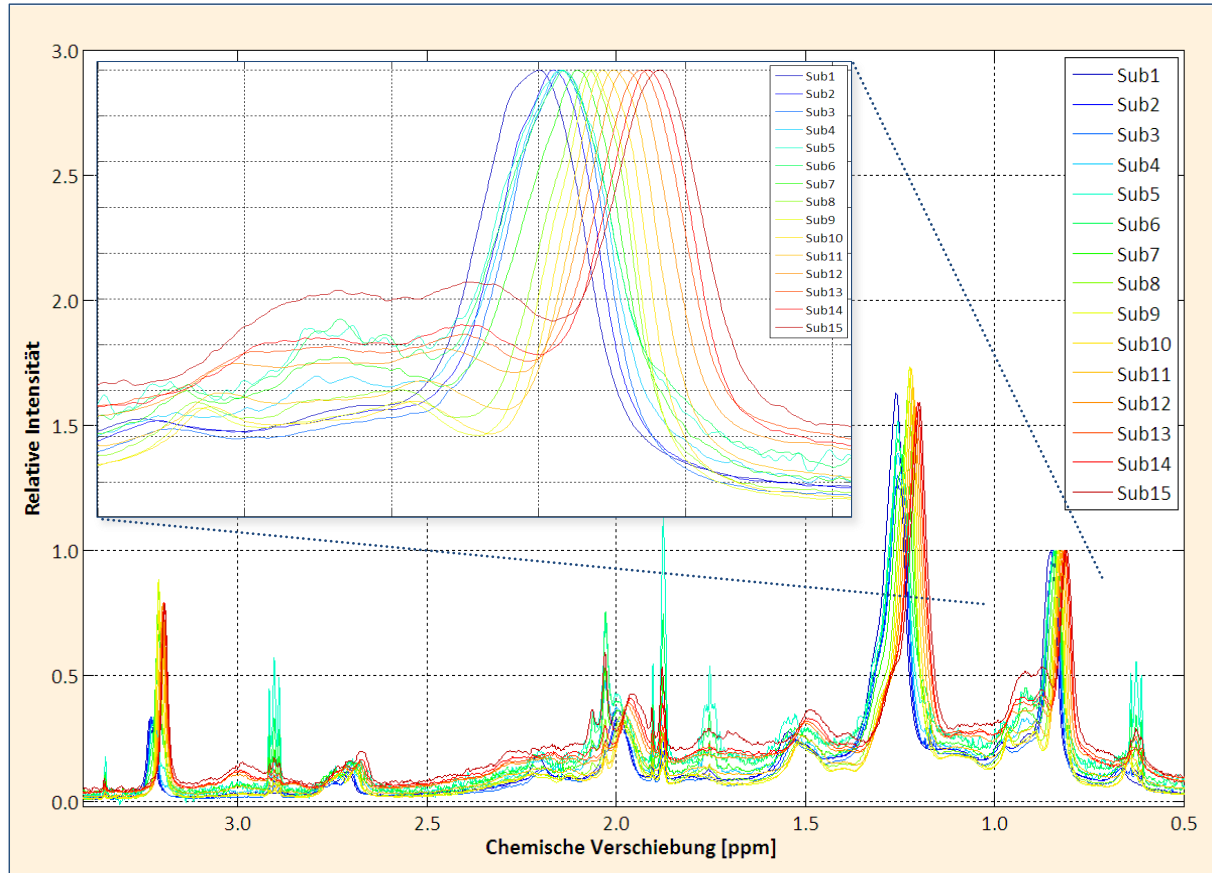
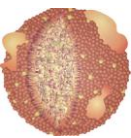


Abb. 4.79: NMR-Spektren von Serumsbfraktionen (Sub1 – Sub15) aus einer Separation über fünf in Reihe geschaltete Gelfiltrationssäulen: Gemessen wurde an einem 600 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 μ L Probe enthielten 100 μ M DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH₃-Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Spektren auf 1.0 normiert

Die von Havel et al. entwickelte Methode zur Isolierung der Lipoproteinklassen über sequentielle Ultrazentrifugation scheint also noch immer die effektivste zu sein⁹, durch den erheblichen Zeitaufwand ist aber die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation gerade für kleinere Partikel vorzuziehen. Die Gelfiltration liefert im Allgemeinen zwar keine absolut reinen Subfraktionen, jedoch ist die Methode deutlich milder und kann unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden.

4.5 UNTERSUCHUNG VON BOVINEM SERUM

Die Struktur von humanen Lipoproteinen ist mittlerweile weitläufig diskutiert, Lipoproteine in anderen Organismen hingegen erst im Anfangsstadium¹⁰⁰. Zur Untersuchung von bovinen Lipoproteinen wurde das entsprechende Serum identisch isoliert wie humanes Serum. Anschließend wurde es über Gelfiltrationssäulen (siehe auch Kapitel 3.2.4 und 4.4.1) subfraktioniert und auf eine einheitliche Absorbanz eingestellt, um Verdünnungseffekte zu vermeiden (siehe Kapitel 4.4.1.1). Zur Struktur von humanen Lipoproteinen siehe auch Kapitel 4.2.

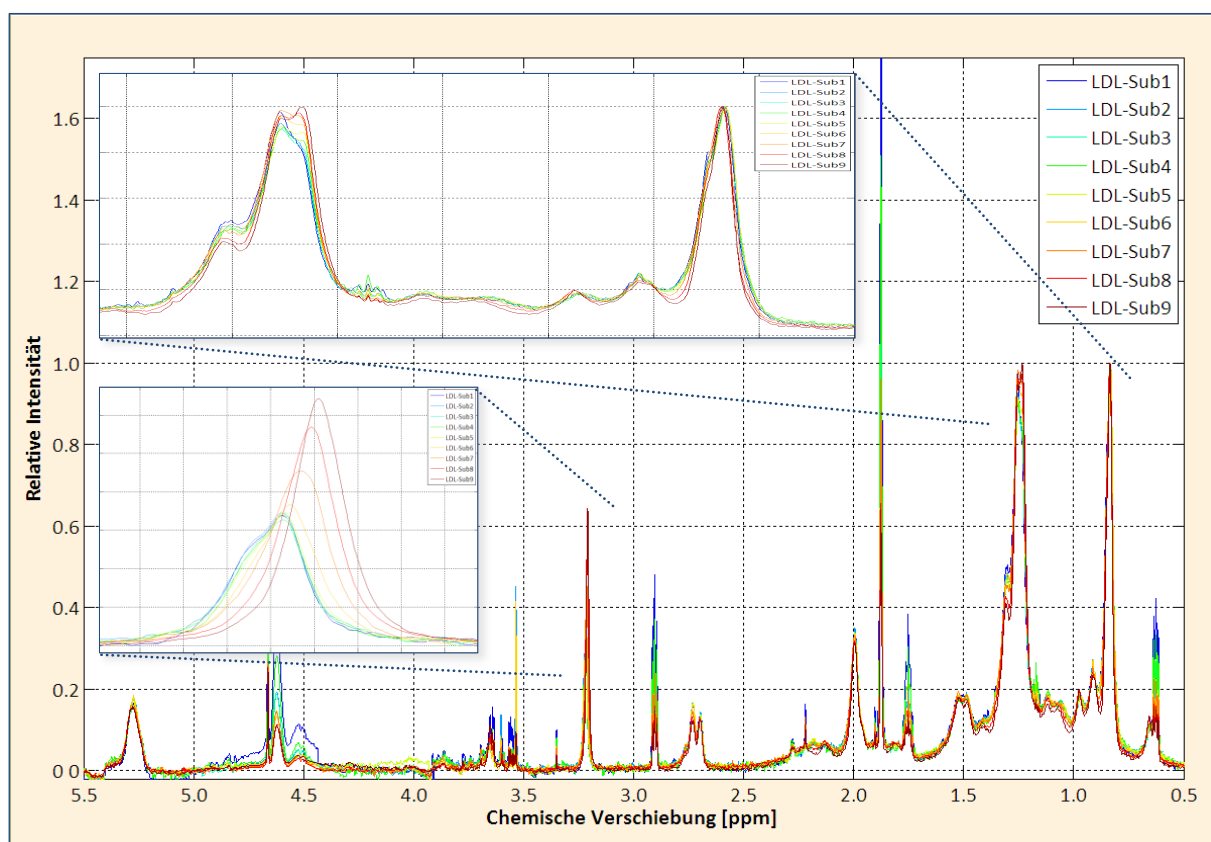
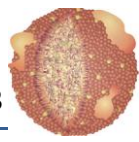
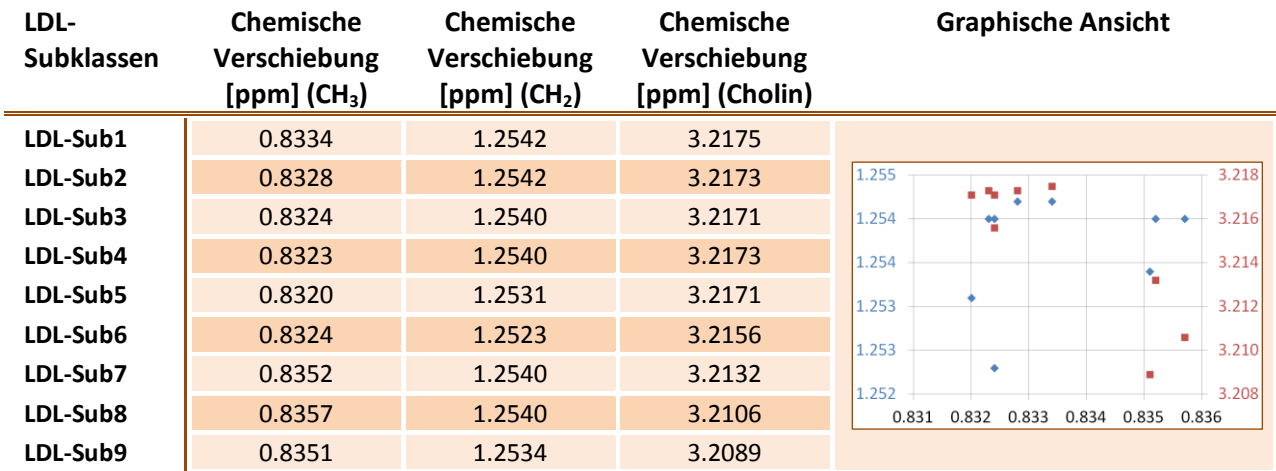


Abb. 4.80: NMR-Spektren von LDL-Subfraktionen (Sub1 – Sub9) aus bovinem Serum (Sub1 entspricht den größten Partikel, Sub9 dem kleinsten): die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert und anschließend an einem ÄKTA-FPLC-System mit einer Frac-900-Fraktioniereinheit über Superose 6 prep grade bei 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit 2 mL/min subfraktioniert; aufgetragen wurden 2 mL konzentriertes LDL, es wurden 9 Fraktionen geschnitten; für alle Proben wurde eine einheitliche Absorbanz von 0.07 eingestellt; gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 µL Probe enthielten 100 µM DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die Signalhöhen der CH₃-Peakmaxima (0.8 - 0.9 ppm) aller Spektren auf 1.0 normiert



In Abb. 4.80 sind die NMR-Spektren der LDL-Subfraktionen dargestellt. Die chemische Verschiebung der CH₃- und CH₂-Gruppen ist bei allen Subfraktionen relativ konstant (Tab. 4.39). Sowohl die Methyl- als auch die Methylen-signale sind aufgespalten und zeigen für unterschiedliche Subklassen leicht unterschiedliche Zusammensetzungen. Die Cholin-Kopfgruppe besitzt für größere LDL-Subklassen eine geringere Signalintensität und eine teilweise Aufspaltung der Linie im Vergleich zu den Subklassen kleinerer Größe.



Tab. 4.39: Maxima einiger aussagekräftiger NMR-Signale der fraktionierten LDL-Subklassen; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH₂-Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH₃-Gruppen aufgetragen

In Abb. 4.81 sind zum Vergleich das NMR-Spektrum von humanem LDL aus Kapitel 4.1, sowie die größte und kleinste LDL-Subklasse des bovinen LDL (Sub1 und Sub9) aus Abb. 4.80 übereinander abgebildet. Die allgemeine Kurvenformen sind sehr ähnlich. Man kann allerdings einige sehr spezielle Unterschiede finden. Die Linien sind in bovinem HDL etwas schmaler und intensiver. Besonders hervorstechend sind die aufgespaltenen Signale der Methyl- und Methylen-Gruppen, die in bovinem LDL zudem etwas hochfeldverschoben sind. Das Cholin-Signal spaltet bei humanem LDL auf, da Phosphatidylcholin und Sphingomyelin in zwei unterschiedlichen Umgebungen vorkommen. Das tieffeld-verschobene Signal entstammt dabei dem des Phosphatidylcholins, das hochfeld-verschobene dem des Sphingomyelins⁶⁷. Bei bovinem LDL ist dies bei der größeren Subfraktion der Fall. Bei der kleineren Subfraktion kann man nur ein Signal erkennen, das in seiner Gesamtintensität zudem etwas höher ist.

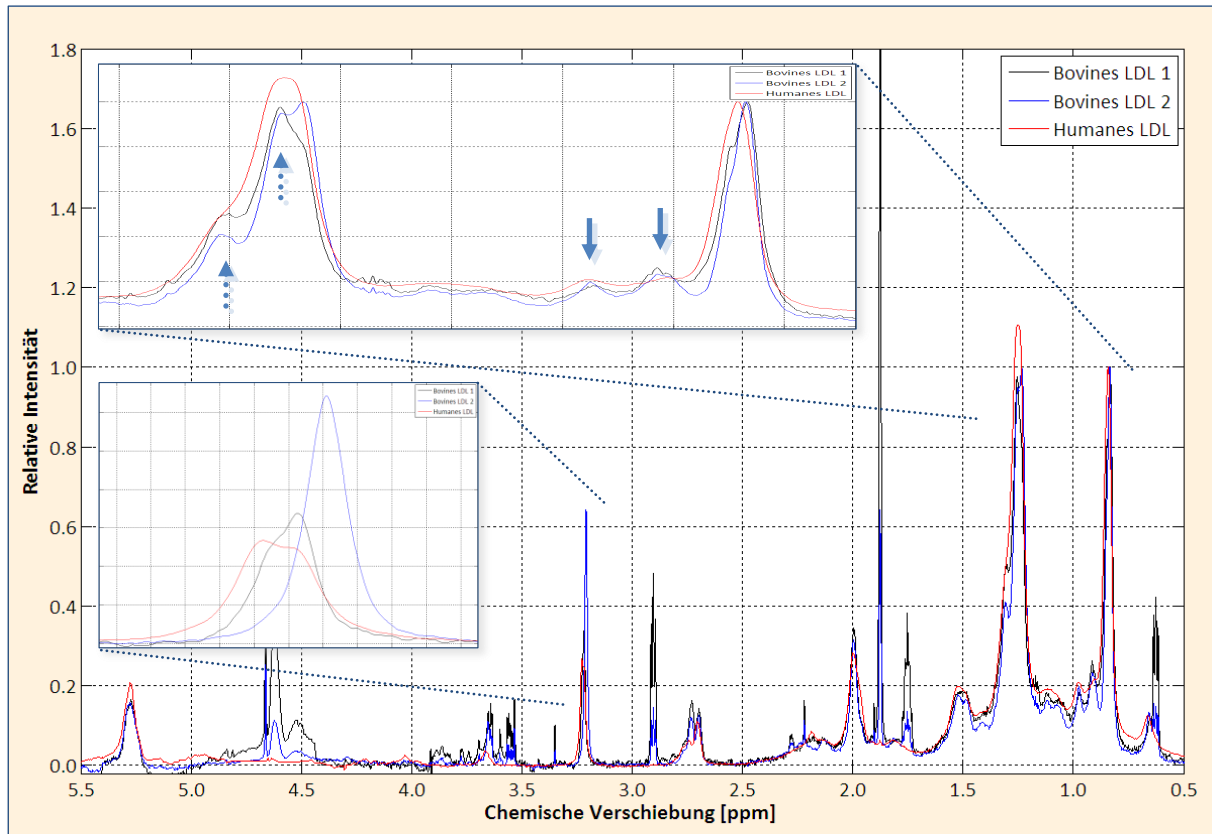


Abb. 4.81: Vergleich der NMR-Spektren von humanem LDL (rot) und zwei bovinen LDL-Subfraktionen (schwarz und blau): das Spektrum von humanem LDL ist aus Abb. 4.4 entnommen, die bovinen LDL-Subfraktionen entsprechen den Subfraktionen Sub1 und Sub9 aus Abb. 4.80); die blauen Pfeile markieren signifikante Cholesterinsignale

Entsprechend der Subfraktionierung von LDL wurden auch HDL-Subfraktionen aus gesamtem bovinem HDL mittels Gelfiltration isoliert. Die gemessenen NMR-Spektren sind in Abb. 4.82 zusammengefasst. Man erkennt eine signifikante Verschiebung bezüglich der x-Achse (Tab. 4.40), was auf verschieden große Partikel hindeutet, wie sie auch in humanem Serum gefunden werden (siehe dazu auch Kapitel 4.4.1). Die Spektren der verschiedenen Subklassen von bovinem HDL sind sich in Form und Zusammensetzung relativ ähnlich.

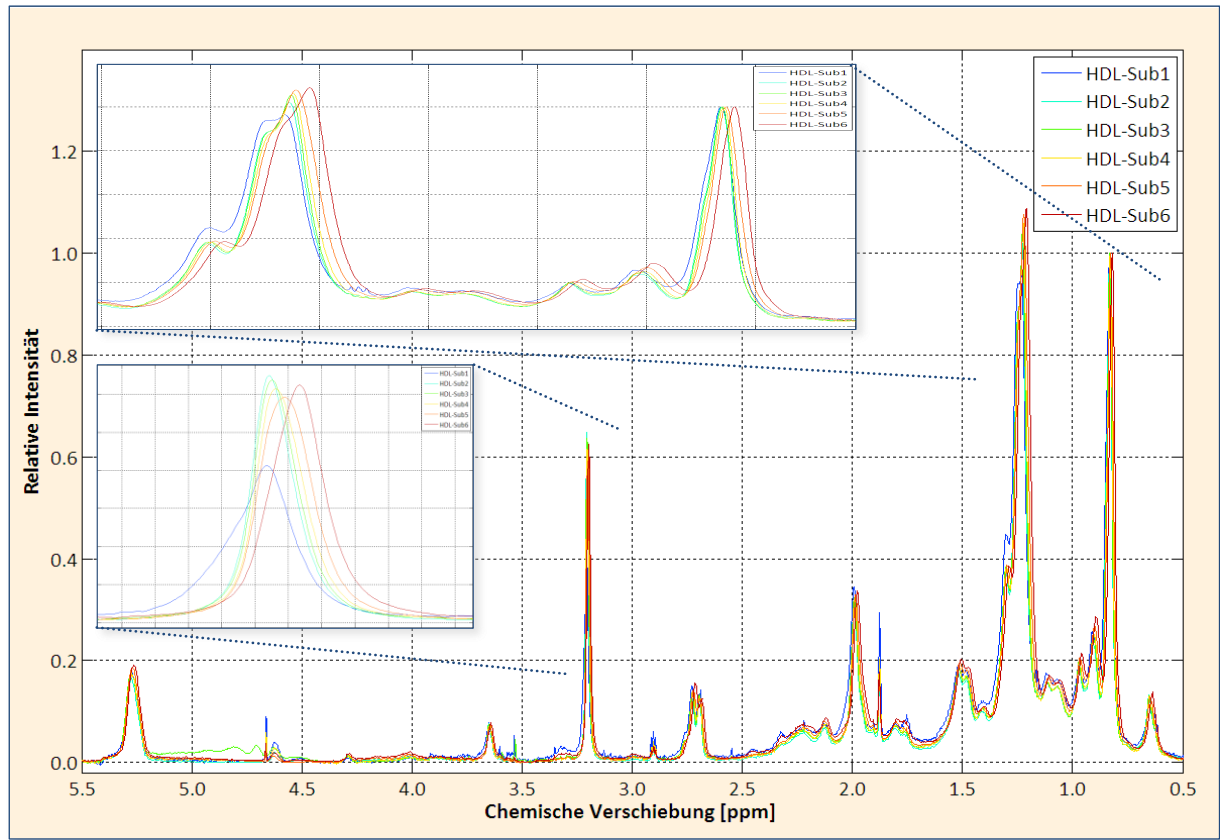
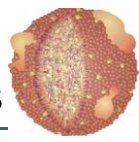


Abb. 4.82: NMR-Spektren von HDL-Subfraktionen (Sub1 – Sub6) aus bovinem Serum (Sub1 entspricht den größtem Partikel, Sub6 dem kleinsten): die Proben wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert und anschließend an einem ÄKTA-FPLC-System mit einer Frac-900-Fraktioniereinheit über Superdex 200 prep grade bei 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit 1 mL/min subfraktioniert; aufgetragen wurde 1 mL konzentriertes HDL, es wurden 6Fraktionen geschnitten; für alle Proben wurde eine einheitliche Absorbanz von 0.1 eingestellt; Gemessen wurde an einem 800 MHz-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d bei 310 K; 500 µL Probe enthielten 100 µM DSS und 5% D₂O in extrazellulärem Puffer (pH 7.4); zur besseren Übersicht wurden die CH₃-Signalmaxima (0.8 - 0.9 ppm) der Spektren der Lipoproteine auf 1.0 normiert

HDL-Subklassen	Chemische Verschiebung [ppm] (CH ₃)	Chemische Verschiebung [ppm] (CH ₂)	Chemische Verschiebung [ppm] (Cholin)	Graphische Ansicht
HDL-Sub1	0.8317	1.2318	3.2064	
HDL-Sub2	0.8310	1.2281	3.2058	
HDL-Sub3	0.8307	1.2265	3.2048	
HDL-Sub4	0.8288	1.2245	3.2038	
HDL-Sub5	0.8270	1.2218	3.2012	
HDL-Sub6	0.8192	1.2098	3.1966	

Tab. 4.40: Maxima einiger aussagekräftiger NMR-Signale der fraktionierten HDL-Subklassen; zur graphischen Ansicht sind die chemischen Verschiebungen der CH₂-Gruppen (blau) und der Cholin-Kopfgruppen (rot) gegen die Verschiebung der CH₃-Gruppen aufgetragen

Auch hier wurden die erhaltenen HDL-Subfraktionen mit isolierten humanen Lipoproteinen verglichen. Dazu wurde die größte Subfraktion, die HDL2 am nächsten kommt, aus bovinem Serum mit humanem HDL2 aus Kapitel 4.1 verglichen (Abb. 4.83) und die kleinste bovine HDL-Subfraktion, die am ehesten HDL3 entspricht, mit humanem HDL3 (Abb. 4.84).

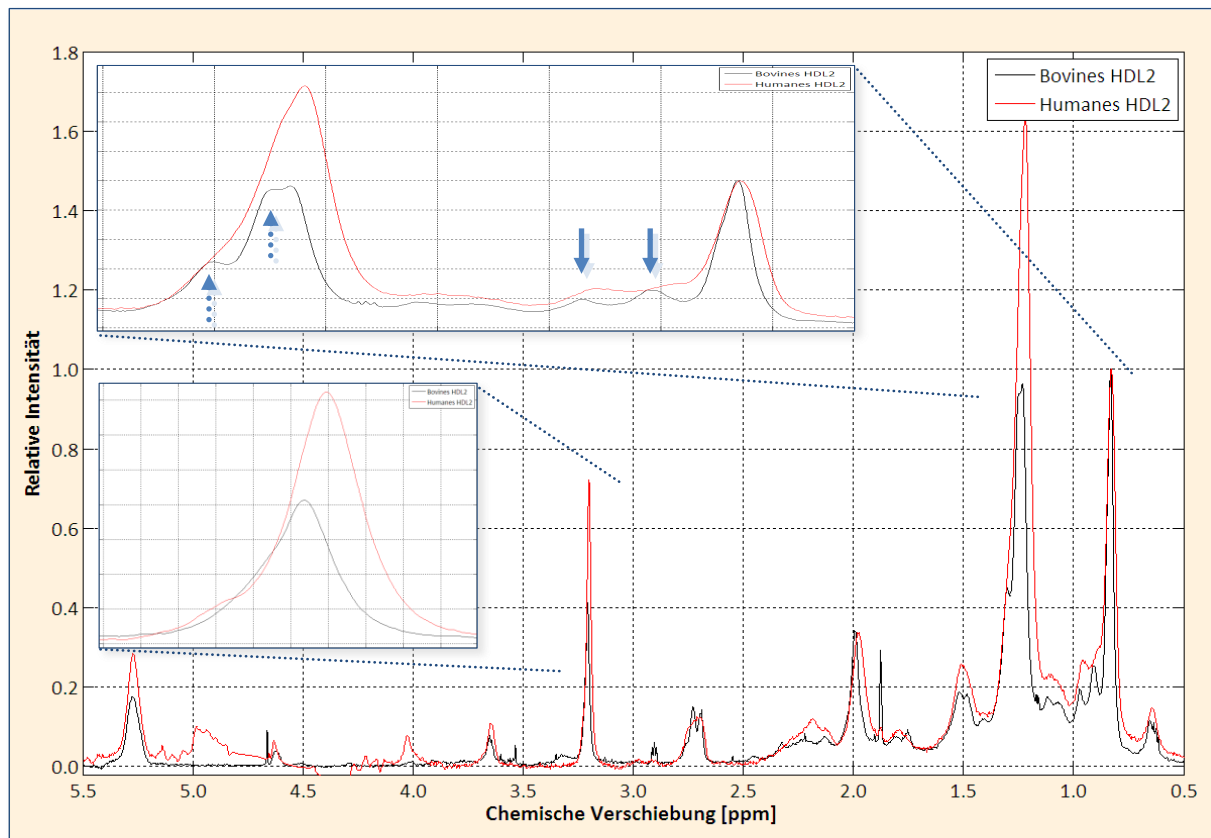


Abb. 4.83: Vergleich der NMR-Spektren von humanem HDL2 (rot) und einer bovinen HDL2-Subfraktionen (schwarz): das Spektrum von humanem HDL2 ist aus Abb. 4.4 entnommen, die bovine HDL2-Subfraktionen entspricht der Subfraktionen Sub1 aus Abb. 4.82 **Abb. 4.80**); die blauen Pfeile markieren signifikante Cholesterinsignale

Wie bei LDL weist HDL2 eine etwas geringere Linienbreite auf. Ebenso kann man signifikante Cholesterin-Signale deutlicher erkennen. Selbes trifft auch auf HDL3 zu. Die Signalintensität der CH₂- und Cholin-Kopfgruppen sind bei bovinem HDL2 und HDL3 geringer als in humanem.

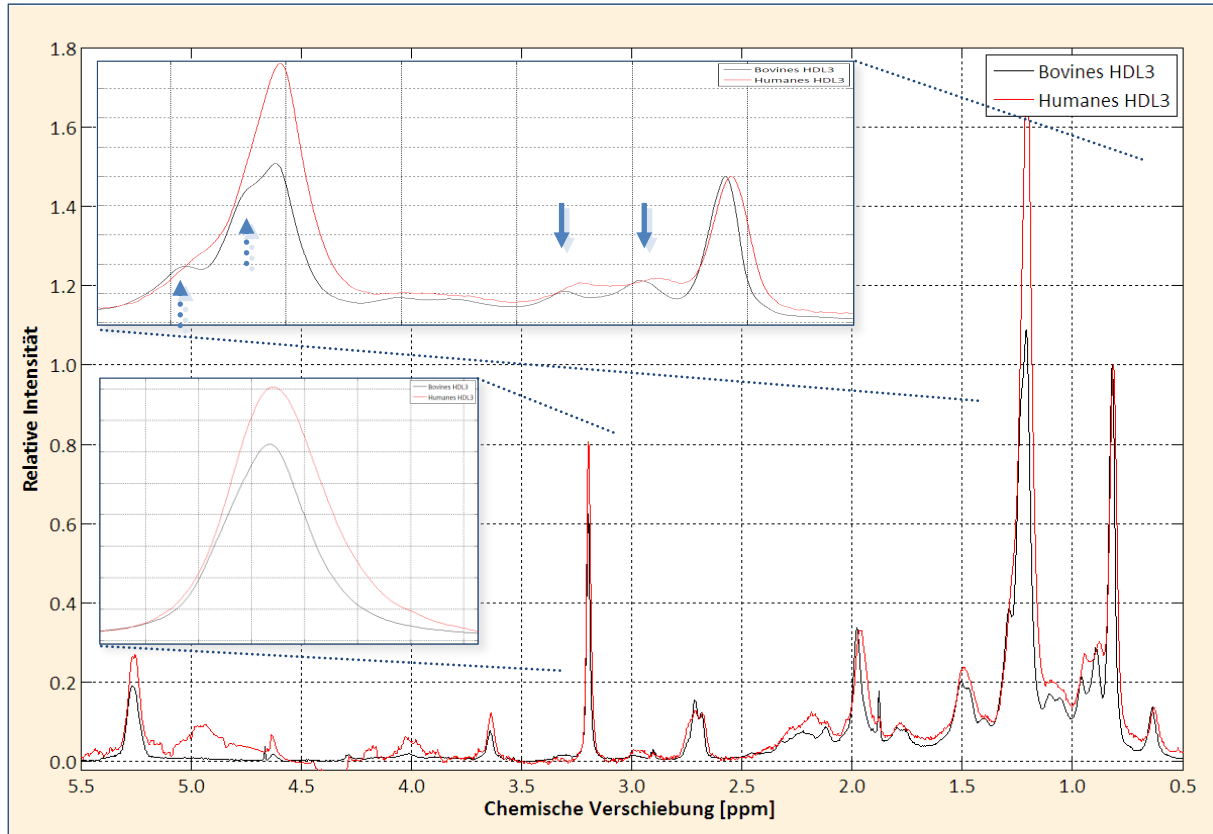
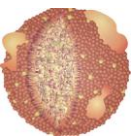


Abb. 4.84: Vergleich der NMR-Spektren von humanem HDL3 (rot) und einer bovinen HDL3-Subfraktionen (schwarz): das Spektrum von humanem HDL2 ist aus Abb. 4.4 entnommen, die bovine HDL2-Subfraktionen entspricht der Subfraktionen Sub1 aus Abb. 4.82 **Abb. 4.80**; die blauen Pfeile markieren signifikante Cholesterinsignale

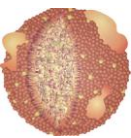
5 DISKUSSION

Im Folgenden werden die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse diskutiert und mit bereits veröffentlichten verglichen. Im ersten Abschnitt werden die verschiedenen Möglichkeiten zur quantitativen Analyse der Lipoproteine in Serum betrachtet. Diese beziehen sich im Wesentlichen auf die Untersuchungen aus Kapitel 4.1, aber auch Kapitel 4.3 wird hiermit abgehandelt. Des Weiteren wird im zweiten Abschnitt die Struktur der Lipoproteine, sowohl aus menschlichem Serum (Kapitel 4.2) als auch aus bovinem (Kapitel 4.5) beleuchtet. Der letzte Abschnitt befasst sich mit der allgemeinen Methodik der Lipoproteinseparation (Kapitel 4.4).

5.1 QUANTITATIVE ANALYSE DER LIPOPROTEINE IN SERUM

5.1.1 QUANTIFIZIERUNG DER LIPOPROTEINE MITTELS NMR

Anfang der 1990er gelang es zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung der Lipoproteine in Serum zu machen³²⁻³³. Dazu nutzten sie Fitmodelle, die das Methylsignal von Serum aus der Signalüberlagerung isolierter Lipoproteinklassen zusammensetzten. Otvos et al. nutzten diese Methode für die Entwicklung eines kommerziellen Assays, der als NMR LipoProfile® von LipoScience bekannt wurde. 2005 stellten Dyrby et al. des Weiteren eine neue Möglichkeit vor, mittels diffusionsgewichteten NMR-Spektren Lipoproteine inklusive Subklassen in Serum zu quantifizieren¹⁰¹. Die Korrelation zu herkömmlichen Analysemethoden war jedes Mal sehr hoch, jedoch ergaben die Ergebnisse der einzelnen Forschungsgruppen keine übereinstimmenden Kurvenformen im Bereich der CH₃-Gruppen, obwohl die Separationsmethode dieselbe war. Otvos et al. nutzen mehrfach aufgespaltenen Signale aller Lipoproteinklassen zur Quantifizierung, Ala-Korpela et al. erhielten für HDL eine gauß'sche Kurvenform, jedoch für LDL und VLDL auch eine Überlagerung von mehreren Frequenzen. In der vorliegenden Arbeit wurden VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3, sowie 2 verschiedene Proteinfractionen (LPDS) aus Serum isoliert. Standardmäßig wurde die sequenzielle Ultrazentrifugation als Separationsmethode verwendet⁹. Alle Proben wurden in denselben Puffer überführt, der den physiologischen Bedingungen des Extrazellulärraums sehr nahe kommt und für NMR-Untersuchungen hervorragend geeignet ist³⁶. Somit wurde die Umgebung der tatsächlich im Körper vorliegenden



Bedingungen deutlich besser simuliert als es bei anderen Gruppen der Fall war. Otvos et al. haben zudem die Messtemperatur von 37 °C auf 40 °C erhöht, um reproduzierbarere Ergebnisse zu erhalten³⁴. Die erhaltene Kurvenform der Methylgruppe war in dieser Arbeit stets eine mehr oder weniger perfekte Gaußverteilung ohne überlagernde Nachbarsignale. Eine solche Überlagerung wurde hier als Verunreinigung durch andere Lipoproteinklassen angesehen (siehe Kapitel 4.4.2).

Durch mathematische Optimierung konnte aus den einzeln isolierten Fraktionen das Originalspektrum von Serum im Bereich von -0.5 ppm bis 3.14 ppm (Minimum) wieder nahezu perfekt zusammengesetzt werden, so dass man davon ausgehen kann, dass weder eine starke Veränderung der Proben durch die Ultrazentrifugation vorlag noch irgendwelche Substanzen verloren gegangen sind (siehe Kapitel 4.1.1). Da die Restintensitäten des in der Probe vorhandenen Wassers nach der Wasserunterdrückung stark variieren können und von der Verdünnung der Probe abhängig sind, wurde der Bereich um 5.0 ppm bei der Berechnung ausgespart und auch höhere Frequenzen nicht berücksichtigt. Hier tragen lediglich diverse Proteinsignale und Doppelbindungen von Fettsäuren zu den Signalen bei. Die erhaltene Lipoproteinverteilung wird in Kapitel 5.1.6 diskutiert.

5.1.2 LIPIDZUSAMMENSETZUNG DER LIPOPROTEINE

Zur detaillierteren Charakterisierung wurde die Lipidzusammensetzung der isolierten Proben mittels NMR bestimmt (siehe Kapitel 4.1.2). Die verwendete Extraktionsmethode wich von üblichen Standardverfahren^{23, 54} ab, da hier keine Extraktion aus Gewebe notwendig war. Srivastava et al. haben 2009 unabhängig von der hier etablierten Methode eine sehr ähnliche vorgestellt^{24, 45}, die allerdings durch die Verwendung von nicht deuteriertem Chloroform und Methanol einen zusätzlichen Trocknungsschritt beinhaltet. Hier wurden direkt deuterierte Lösungsmittel benutzt, was zu einer Zeitersparnis führte und die Gefahr unerwünschter Oxidationsreaktionen der Lipid-Doppelbindungen verringert (siehe Kapitel 4.1.2.1).

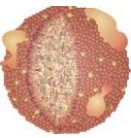
Mit Hilfe von Standardspektren reiner Lipide und 2D-NMR-Spektren konnte eine vollständige Zuordnung der Lipidsignale erreicht werden (siehe Kapitel 4.1.2.3), die sich mit bereits bekannten Ergebnissen deckte^{24, 55-58, 72}. Über geeignete Integration der NMR-Spektren war es nun möglich, die molare Zusammensetzung der wichtigsten Lipidvertreter zu bestimmen (siehe Kapitel 4.1.2.4).

Überlagerungen einzelner Signale konnten weitestgehend durch Subtraktion entsprechend korrelierender Signalintensitäten behoben werden. Lediglich eine separate Korrektur der Baseline wurde in einigen Fällen durchgeführt, da sehr kleine Signale häufig auf den Flanken intensiver Nachbarsignale lagen. Die Zusammensetzung der Fettsäuren wurde ebenfalls abgeschätzt. Dies war nur möglich, indem als Startwert biologisch sinnvolle Daten eingesetzt wurden und anschließend eine Optimierung durchgeführt wurde. Die korrekte Zusammensetzung der Fettsäuren lässt sich mit Hilfe der NMR nicht bestimmen. Die Ergebnisse der Lipidzusammensetzung korrelieren sehr gut mit Literaturwerten¹⁰²⁻¹⁰³ und geben auch metabolisch sinnvolle Werte wieder.

Die ApoB-enhaltenden Partikel VLDL, IDL und LDL geben kontinuierlich Triacylglyceride als Energieeinheit an Zellen ab und werden so ineinander umgewandelt. ApoCII aktiviert dazu eine Lipoproteinlipase (LPL), die die Triacylglyceride zu Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert. Gleichzeitig wird freies Cholesterin durch eine Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) zu Cholesterinester umgewandelt^{1, 3, 104}. Entsprechend sinkt der Gehalt der Triacylglyceride von VLDL über IDL bis hin zu LDL. Im Gegensatz dazu nimmt der relative Gesamtcholesteringehalt zu und auch das Verhältnis von Cholesterinester zu Cholesterin steigt mit schwindender Partikelgröße. Der Anteil der Sphingolipide und Phosphoglyceride ändert sich hingegen kaum.

Die ApoA-enhaltenden Partikel HDL2 und HDL3 nehmen Cholesterin aus den Zellen auf, speichern es in Form von Cholesterinester (unter Einfluss der LCAT) und transportieren es zurück zur Leber^{1, 3}. Somit enthalten sie folgerichtig deutlich weniger Triacylglyceride und relativ viel Gesamtcholesterin. In HDL2 ist mengenmäßig mehr Cholesterin enthalten als in HDL3, dafür weniger Phosphoglyceride und Sphingomyeline. Dies ist auf den höheren Radius, beziehungsweise das geringere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, zurückzuführen.

Das Verhältnis der Cholesterinester zu Cholesterin ist ganz entscheidend von der Partikelgröße abhängig und nimmt stetig zu kleineren Partikeln hin zu. Das ist erstaunlich, da Cholesterinester durch seine hydrophoben Eigenschaften hauptsächlich im Kern zu finden sein sollte und in kleineren Partikeln entsprechend geringer vertreten. Allerdings gibt es neueste Strukturbetrachtungen, die eben diesen erhöhten Gehalt an Cholesterinester mit einbeziehen und ein Vorkommen von Cholesterinester in der Membran vorschlagen¹².



5.1.3 SICHTBARKEIT DER LIPIDE IN NMR-SPEKTREN VON LIPOPROTEINEN

In Kapitel 4.1.2.5 wurden die NMR-Spektren der Lipoproteinklassen mit denen der daraus extrahierten Lipide quantitativ verglichen. Dies war nur anhand des Signals der CH_2 -Gruppen zwischen zwei Doppelbindungen zu bewerkstelligen, das bei etwa 2.8 ppm von allen anderen Signalen separiert vorlag. Das Integral dieses Signals war in den Lipoproteinpartikeln um 55-75% kleiner als das entsprechende in den extrahierten Lipiden. Die gepackte Struktur der Lipoproteine verhindert somit eine vollständige Sichtbarkeit der Lipidsignale selbst in den flexiblen VLDL-Partikeln (siehe dazu auch Kapitel 5.2.4).

5.1.4 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Anhand von Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der Lipoproteinklassen konnte eine Größenverteilung der Lipoproteine bestimmt werden (Kapitel 4.1.3). Diese stimmten mit bekannten Ergebnissen überein¹⁴, obwohl es durch die Trocknung der Lipoproteine auf den Grids zu einer Abflachung und somit zu einem scheinbar größeren Radius kommen kann. Durch die Probenpräparation war es auch nicht möglich diskoidale Partikel zu erkennen, die mittlerweile weitläufig diskutiert werden⁵⁹⁻⁶⁰. Die Partikel wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgezählt und deren Größenverteilung bestimmt. Abgesehen von VLDL wiesen alle Lipoproteinklassen eine gauß'sche Verteilung bezüglich ihrer gefundenen Durchmesser auf, die lediglich in ihrem Maximum schwankte.

Eine automatische Auszählung der Partikelgrößen in Serum war nicht möglich. Durch die vorhandenen Proteine, die als Rauschen im Hintergrund zu sehen waren, wurden unverhältnismäßig viele kleine Partikel gefunden. Deshalb wurden die Größen der Lipoproteine von unabhängigen Betrachtern manuell ausgezählt. Die erhaltene Lipoproteinverteilung wird in Kapitel 5.1.6 diskutiert.

5.1.5 QUANTIFIZIERUNG DER LIPOPROTEINKLASSEN AN DIFFUSIONSGEWICHTETEN NMR-SPEKTREN

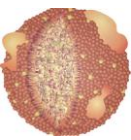
In Kapitel 4.1.4 wurde eine alternative Methode zur quantitativen Analyse von Serum ausgetestet. Dazu wurden diffusionsgewichtete NMR-Spektren der isolierten Lipoproteinklassen und

Serumproteine aufgenommen und deren relative Diffusionskoeffizienten bestimmt. Diese nahmen wie erwartet kontinuierlich hin zu kleineren Partikeln zu. Anschließend wurden die so erhaltenen Diffusionskoeffizienten genutzt, um identisch gemessene Spektren von Serum zu analysieren. Mit einer Fitroutine wurde das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten bei jedem Frequenzwert bestimmt, woraus sich für den gesamten Bereich ein Verhältnis der Lipoproteine zueinander ableiten ließ. Die relativen Signalhöhen der aus der Fitfunktion berechneten Amplituden entsprachen im Prinzip einzelnen separierten Spektren der Lipoproteine, welche wie die Originalspektren eine gewisse Verschiebung gegen die x-Achse zeigten. Die erhaltene Lipoproteinverteilung wird in Kapitel 5.1.6 diskutiert.

5.1.6 ÜBERBLICK ÜBER DIE QUANTITATIVEN ANALYSEMÖGLICHKEITEN DER LIPOPROTEINE

Die Fülle an Quantifizierungstechniken, die in dieser Arbeit an identischen Proben durchgeführt wurde, erlaubt einen direkten Vergleich der Methoden und zusammen mit klinischen Analysen zur Cholesterinbestimmung aus Kapitel 4.1.5 eine absolute Bestimmung von Konzentration und Zusammensetzung der Lipoproteine in Serum.

Zum einen wurden NMR-Spektren von ganzen Lipoproteinen analysiert. In Kapitel 4.1.2.5 wurde gezeigt, dass die Signale der unterschiedlichen Lipoproteine aufgrund ihrer mehr oder weniger dichten Packung unterschiedlich gut sichtbar sind. Entsprechend müssen all diese Spektren um den jeweiligen Faktor korrigiert werden, um ein vergleichbares Ergebnis zu erhalten. In Kapitel 4.1.1 wurde das NMR-Spektrum von Serum aus den Spektren der daraus isolierten Lipoproteine wieder vollständig simuliert. Hier wurde ein LDL:HDL-Verhältnis der Spektrenintensität von 39:61 gefunden. In Kapitel 4.1.4 wurden die relativen Diffusionskoeffizienten der Lipoproteinklassen berechnet und durch Linearkombination deren Beitrag zur Diffusion in Serum berechnet. So wurden separierte Spektren errechnet, die nach der oben beschriebenen Korrektur der Sichtbarkeit in einem LDL:HDL-Verhältnis von 28:72 resultieren, das sich wiederum auf die Spektrenintensität bezieht. Bei dieser Quantifizierungsmethode wurde ein mittlerer Diffusionskoeffizient für alle chemischen Verschiebungen verwendet, der sich aus den Intensitäten der Methyl- und Methylen-signale definiert. Eine exaktere Bestimmung wäre möglich, wenn man für jede chemische Verschiebung auch den exakten Diffusionskoeffizienten verwenden würde. Was die Sichtbarkeit der Signale anbelangt, so ist



die Korrektur nur anhand des Signals der CH₂-Gruppen zwischen zwei Doppelbindungen möglich, da alle anderen Signale nicht quantitativ erfasst werden können (Kapitel 4.1.2.5). Dies birgt sicherlich einen gewissen Fehler.

Zum anderen wurden die Ergebnisse der Lipidverteilung für eine quantitative Aussage herangezogen. Die Lipidverteilung an sich birgt dabei einen eher geringen Fehler, will man aber auf die Anzahl der gesamten Partikel schließen, muss die Anzahl der Lipide pro Partikel bekannt sein. Hierzu wurden mittlere Werte aus der Literatur als gute Näherung herangezogen¹³. Zusätzlich war eine Korrektur um die molare Masse nötig, die ebenfalls im Mittel abgeschätzt wurde. Über die subjektive Auszählung der Lipoproteine in den Elektronenmikroskopie-Aufnahmen konnte ein molares Verhältnis von LDL:HDL von 53:47 bestimmt werden.

Die Ergebnisse der enzymatischen Cholesterinbestimmung ließen eine Abschätzung der Konzentration der Lipoproteine in Serum zu, welche für LDL zu $3.8 \cdot 10^{-8}$ mol/L und für HDL zu $3.5 \cdot 10^{-6}$ mol/L berechnet wurde. Das molare Verhältnis nach dieser Bestimmung lag bei 13:87.

Für jede Analysemethode wurden andere Ergebnisse erhalten, da jede Methode andere Unsicherheiten birgt, es bleibt demnach abzuwägen, welche Daten den tatsächlich vorhandenen am nächsten kommen. Es wurden des Weiteren wichtige Resultate im Bezug auf die Lipidzusammensetzung und Größenverteilung der einzelnen Lipoproteinklassen erhalten und das Diffusionsverhalten in Lösung eingehender studiert.

5.1.7 ANALYSE DER APOLIPOPROTEINSIGNALE

In Kapitel 4.3 wurden die NMR-Spektren der Lipoproteinklassen nach ihrem Beitrag von Apolipoproteinen analysiert. Dazu wurden analog zu Kapitel 4.1.4 die Diffusionskoeffizienten der Lipoproteinklassen bestimmt, allerdings anhand des Diffusionsabfalls des Methylsignals bei verschiedenen Verschiebungen. Die diffusionsgewichteten Spektren von Serum ließen sich allerdings ausschließlich mit den Diffusionskoeffizienten der Serumproteine beschreiben. Auch wenn einige Signale innerhalb isolierter Lipoproteine sichtbar sind und ein charakteristisches Muster im Bereich der Aromaten und NH-Gruppen zeigten, waren in Serum keinerlei spezifischen Signale zu detektieren.

Die Anwesenheit der Serumproteine war deutlich höher und überlagerte die Apolipoproteinsignale um ein Vielfaches.

5.2 EVALUATION DER LIPOPROTEINSTRUKTUR

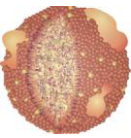
In Kapitel 4.2.1 wurden die Struktur von VLDL, LDL und HDL2 anhand von temperaturabhängigen NMR-Spektren und insbesondere T_2 -Zeit-Messungen untersucht und mit den jeweiligen Daten von Serum verglichen. Außerdem wurden Hochdruck-NMR-Messungen an Serum durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse einzeln diskutiert und mit den Daten der aus denselben Proben extrahierten Lipide aus Kapitel 4.1.2.4 verglichen.

Des Weiteren werden die Ergebnisse aus Kapitel 4.5 zur Struktur von bovinem LDL und HDL analysiert.

5.2.1 VLDL

VLDL besteht nur zu etwa 36%¹ aus Cholesterin (22% Cholesterinester und 14% freies Cholesterin). Es besitzt 21% Phosphoglyceride und 4% Sphingolipide, sowie einen mit 38% sehr hohen Gehalt an Triacylglyceriden, aufgrund dessen ein Phasenübergang in VLDL sehr umstritten ist¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. In Untersuchungen mit dynamischer Differenzkalorimetrie wurde kein Indiz für einen solchen gefunden¹⁰⁷. Andere Forschungsgruppen schließen die Möglichkeit eines Phasenübergang nicht gänzlich aus¹⁰⁸. In den hier gemessenen temperaturabhängigen NMR-Spektren sind die Cholesterinsignale bei niedrigen Temperaturen stark verbreitert, so dass sie als Signal kaum detektierbar sind, und nehmen erst bei Temperaturerhöhung an Signalintensität zu. Dabei kann zwischen Cholesterin in der Membran und Cholesterinester oder freiem Cholesterin im Kern nicht unterschieden werden. Dieses Phänomen deutet auf einen Phasenübergang hin. Auch das Signal der Cholin-Kopfgruppen, die sich ausschließlich in der Membran befinden, zeigt ein ähnliches Verhalten. Somit kann man davon ausgehen, dass in der Hülle eine strukturelle Umwandlung stattfindet. Eine Umwandlung im Kern kann nicht ausgeschlossen werden, jedoch deutet der geringere Signalanstieg

¹ Alle %-Angaben beziehen sich auf das molare Verhältnis



der Methyl- und Methylengruppen im Vergleich zu LDL lediglich auf eine strukturelle Umwandlung in der Membran hin (siehe auch Kapitel 5.2.2).

Die beobachtete Hochfeldverschiebung wurde bereits mehrfach diskutiert und kann einer unterschiedlichen Suszeptibilität im ungeordneten Partikelkern und der klar strukturierten Membran zugeordnet werden^{35, 73}.

Die T_2 -Zeiten, die in VLDL berechnet wurden, waren im Vergleich zu LDL und HDL2 deutlich höher. Würde man von einem starren Partikel ohne interne Beweglichkeit ausgehen, würde die T_2 -Relaxation von größeren Partikeln aufgrund einer eingeschränkten Rotationsdiffusion deutlich langsamer von statten gehen als bei kleineren Partikeln. Der Einfluss der internen Beweglichkeit ist hier also deutlich ausgeprägt. Die Bewegung der endständigen CH_3 -Gruppen ist im Allgemeinen weniger eingeschränkt als die der CH_2 -Gruppen. Insbesondere die Komponenten, die zum tieffeldverschobenen Teil des Methylsignals beitragen, zeigen eine erhöhte Flexibilität.

5.2.2 LDL

Die Struktur von LDL wurde bereits vielfach diskutiert. In der hier betrachteten Probe wurden 67%² Cholesterin gefunden (48% Cholesterinester und 19% freies Cholesterin), außerdem 22% Phosphoglyceride, 6% Sphingolipide und lediglich 4% Triacylglyceride. Die Daten korrelieren sehr gut mit Ergebnissen von anderen Forschungsgruppen¹³.

LDL besitzt bekanntermaßen einen Phasenübergang im Inneren des Partikels von einer smektischen in eine ungeordnete Phase bei etwa 30 °C^{63-65, 105, 109}. Bei niedrigeren Temperaturen geht man von einer radialen Anordnung der Cholesterinester im Kern und einer Verzahnung von Cholesterinpaaren aus¹⁰⁶. Etwa 1/3 der Cholesterinmoleküle befinden sich im Kern, 2/3 in der Hülle des Partikels⁶². Die Übergangstemperatur hängt von der chemischen Zusammensetzung ab und ist invers proportional zum Verhältnis der Triacylglyceride zu Cholesterinester⁶⁵. Zusätzlich kommt es zu einer Diskontinuität ab einem kritischen CE/TG-Verhältnis von 7:1, oberhalb dessen sich sämtliche Triacylglyceride im

² Alle %-Angaben beziehen sich auf das molare Verhältnis

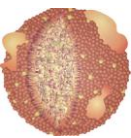
Innersten befinden und sich darum herum eine Schicht aus Cholesterinestern ausbildet¹¹⁰. Hier betrug das Verhältnis etwa 12:1. Ein weiterer Phasenübergang wurde bei etwa 20 °C in der Membran detektiert^{66, 111}.

Die gemessenen NMR-Spektren bestätigten bereits bekannte Ergebnisse¹¹² und zeigten einen signifikanten Signalanstieg zu höheren Temperaturen. Cholesterinsignale sind ähnlich wie in VLDL erst ab einer Temperatur von etwa 30 °C zu detektieren. Ebenso findet man einen Signalanstieg der Cholin-Signale, was einen Phasenübergang in der Membran beschreibt. Im Gegensatz zu VLDL sind aber auch die Methyl- und Methylengruppen, sowie alle übrigen funktionellen Gruppen, stark temperaturabhängig. Da in LDL ein Phasenübergang auch im Kern der Partikel stattfindet, ist dieses Verhalten ein Indiz für diesen inneren Phasenübergang.

Das Signal der Cholin-Kopfgruppen spaltet zu höheren Temperaturen hin in zwei lokale Maxima auf. Phosphoglyceride sind gegen die Sphingomyeline leicht tieffeldverschoben^{67, 113}. Neueste Erkenntnisse zeigen sogar eine Aufspaltung in drei Signale, wenn Lyso-Phosphatidylcholin in LDL nachweisbar ist¹¹⁴. Diese Beobachtung wurde hier nicht gemacht. Der Anstieg der Signalintensität, die auf Phosphoglyceride zurückzuführen ist, ist etwas höher als der Signalanstieg der Sphingomyelin-Signale. Man geht davon aus, dass Sphingomyeline mit freiem Cholesterin in der Membran bevorzugt wechselwirken und es zu lokalen Anhäufungen dieser Lipide kommt. Im Gegensatz dazu sind in anderen Bereichen viele Phosphoglyceride zu finden. Hier sind die Lipide weniger dicht gepackt, so kann man eine höhere Beweglichkeit der Phosphoglyceride gegenüber den Sphingomyelinen erwarten¹¹⁻¹². Ferner sind Phosphoglyceride durch ApoB100 teilweise immobilisiert und können nicht vollständig mit Hilfe der NMR detektiert werden¹³.

Der tieffeldverschobene Bereich des Methylen-Signals ist in LDL besonders stark ausgeprägt. Da LDL einen verhältnismäßig hohen Cholesterinanteil besitzt und sich in dem Bereich vor allem auch entsprechende Signale befinden, liegt die Vermutung nahe, dass eben diese Signale durch Cholesterin verursacht werden.

Auch in LDL ist eine chemische Verschiebung hin zu höheren Feldern zu beobachten. Parks et al. haben dieses Verhalten eingehend studiert und festgestellt, dass oberhalb der



Umwandlungstemperatur eine positive Korrelation zwischen Partikelgröße und chemischer Verschiebung besteht⁷³.

Die T_2 -Zeiten von LDL waren im Vergleich zu VLDL fast um einen Faktor fünf kleiner, stiegen aber oberhalb der Übergangstemperatur deutlich an. Bei niedrigen Temperaturen war die interne Beweglichkeit aufgrund der Packung der Lipide extrem eingeschränkt. Auch hier war der tieffeld-verschobene Bereich der CH_3 -Gruppen-Signale deutlich beweglicher. Die Cholesteringruppen zeigten eine durchwegs geringe Beweglichkeit. Cholesterin besitzt ein sehr rigides Sterol-Rückgrat, wodurch die Flexibilität der einzelnen Gruppen stark behindert wird. Die Beweglichkeit der Cholin-Gruppe nahm stetig mit der Temperatur zu und es war kein signifikanter Unterschied zwischen Phosphoglyceriden und Sphingomyelinen zu erkennen, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Murphy et al.⁶⁷. Allerdings wurde bei der Fitroutine nur ein variabler Wert für T_2 zugelassen und nicht zwei.

5.2.3 HDL2

Für HDL wurden 54%³ Cholesterin (40% Cholesterinester und 14% freies Cholesterin), 34% Phosphoglyceride, 6% Sphingolipide und 4% Triacylglyceride gemessen. Der Gehalt an Phosphoglyceriden ist im Vergleich zu den größeren Partikeln erhöht, da das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bei kleineren Partikeln entsprechend ausgeprägter ist. Cholesterin befindet sich zu etwa 60% in der Membran, zu 40% im Inneren des Partikels, es findet allerdings ein schneller Austausch zwischen den Umgebungen statt⁶¹.

Die Intensität der NMR-Spektren nimmt wie erwartet zu höheren Temperaturen hin zu, jedoch nicht so signifikant wie in LDL. Für HDL wurde ein Phasenübergang in der Membran bei etwa 20 °C gefunden⁶⁶, nicht aber im Kern der Partikel, was aufgrund des niedrigen Gehalts an Triacylglyceriden eigentlich nicht der Theorie entspricht, aber die hier gemessenen Daten bestätigt¹¹⁵. Erstaunlicherweise wurde allerdings kein nennenswerter Anstieg der Cholin-Kopfgruppen-Signale detektiert, lediglich eine ausgeprägte Hochfeldverschiebung. Zusätzlich spaltet das Signal bei höheren Temperaturen leicht auf, so dass ein Nebensignal zu erkennen ist, das den Phosphoglyceriden

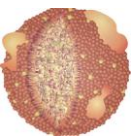
³ Alle %-Angaben beziehen sich auf das molare Verhältnis

zuzuordnen wäre^{67, 113}. Dies ist aber wegen des deutlich geringeren Sphingomyelingehalts sehr unwahrscheinlich und deutet eher auf eine chemische Verschiebung anhand von unterschiedlichen Umgebungen hin. Die Signale des Cholesterins kann man wie schon in VLDL und LDL diskutiert erst ab einer Temperatur von etwa 30 °C sinnvoll detektieren. Hier scheint also tatsächlich eine strukturelle Umlagerung in der Membran vorzuliegen, auch wenn das Cholin-Signal diesen Befund nicht bestätigt.

Die Beweglichkeit der Lipide in HDL2 ist höher als in LDL, auch oberhalb der Phasenübergangstemperatur des letzteren, obwohl die sterische Hinderung aufgrund der höheren Krümmung zunehmen müsste. Es kann aber hier durchaus die Partikelgröße an sich einen Einfluss haben. Wie zu Beginn des Kapitels 4.2 diskutiert, können starre Partikel mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben werden²⁸. Somit würde die Beweglichkeit kleinerer globulärer Aggregate durch die höhere Rotationsdiffusion zunehmen. Man findet hier zwar zusätzlich interne Beweglichkeit, aber dieser Überlegung sollte als zusätzlicher Betrag berücksichtigt werden. Die T_2 -Zeit der Cholin-Kopfgruppe ist in HDL2 verhältnismäßig hoch. Möglicherweise ist die Bewegung aufgrund der höheren Krümmung begünstigt. Es ist aber auch denkbar, dass die Apolipoproteine in HDL2 nicht so eine sterische Hinderung darstellen wie in LDL, was auch den zu geringen Signalanstieg der Cholin-Signale erklären würde. Die Beweglichkeit der CH_3 -Gruppen ist wie in allen Partikeln beobachtet, etwa doppelt so hoch wie in CH_2 -Gruppen.

5.2.4 VERGLEICH DER TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER LIPOPROTEINE

In LDL wurde aufgrund des Phasenübergangs im Kern der höchste Signalanstieg der NMR-Spektren detektiert, gefolgt von HDL2 und VLDL. Otvos et al. zeigten, dass eine quantitative Bestimmung der Lipoproteine mittels NMR bei 40 °C akkurater ist als bei 23 °C³⁴. In dieser Arbeit wurden alle NMR-Spektren bei 37 °C, also Körpertemperatur aufgenommen, um unter möglichst physiologischen Bedingungen zu bleiben. Die Intensitäten der NMR-Spektren strebten zu höheren Temperaturen gegen einen Sättigungswert, der bei 50 °C noch nicht vollständig erreicht war. Bei 37 °C erhielt man für VLDL und HDL2 jedoch schon beinahe 100% der Signalintensität, die bei 50 °C detektiert wurde. Für LDL waren es etwa 90%. In Kapitel 4.1.2.5 wurde die Signale bei 37 °C mit den Integralen der extrahierten Lipide verglichen, um zu zeigen, wie groß der Anteil der Sichtbarkeit absolut war. Es stellte sich heraus, dass in VLDL etwa 68% der Signale sichtbar waren, in LDL 74% und in HDL2 58%.



Unter der Annahme, dass die Sichtbarkeit der Proteinsignale über den gesamten Temperaturbereich mehr oder weniger konstant blieb, waren also auch bei 50 °C noch nicht alle Lipide sichtbar.

5.2.5 SERUM

Temperaturabhängige NMR-Spektren verhielten sich wie eine Mischung aus den isolierten Einzelfractionen. Anhand der vorab diskutierten Ergebnisse konnten aber Details in der Kurvenform dem Verhalten einzelner Lipoproteine zugeordnet werden. Die Beweglichkeit der Serumproteine (LPDS) blieb über den gesamten Temperaturbereich konstant niedrig, so dass hier kein signifikanter Einfluss auf die Kurvenform zu erkennen war.

Zusätzliche strukturelle Informationen wurden anhand von Hochdruck-NMR-Messungen erhalten. Zum Vergleich wurde Serum bei 10 °C und bei 40 °C gemessen. Beide Male erhielt man bei höheren Drücken eine geringere Signalintensität, wobei besonders das Methylensignal eine rapide Abnahme zeigte. Die Cholesterinsignale, die bei 40 °C deutlich zu sehen waren, wurden durch erhöhte Drücke wieder stark verbreitert, was zu der Annahme führt, dass hier eine Phasenumwandlung stattfindet, wie sie umgekehrt bei erhöhter Temperatur zu sehen war. Der Signalabfall der CH₂-Gruppe deutet zusätzlich auf einen Phasenübergang im Inneren der Partikel hin, wie er bei LDL zu niedriger Temperatur hin detektiert werden konnte. Da das Signal über den gesamten CH₂-Bereich relativ konstant abnimmt, kann man davon ausgehen, dass alle Partikel von einer Strukturumwandlung betroffen sind. Um dies jedoch im Detail zu beurteilen, müssten isolierte Proben separat untersucht werden.

Die chemische Verschiebung der druckabhängigen Spektren korreliert nicht mit den Spektren bei unterschiedlicher Temperatur. Da aber als Referenz hier Alanin und nicht DSS verwendet wurde, sind diese Daten nicht vergleichbar.

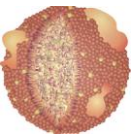
5.2.6 BOVINE LIPOPROTEINE

Bovines LDL wurde mittels Ultrazentrifugation aus Serum isoliert und durch NMR-Untersuchungen charakterisiert. Die Kurvenform war dem humanen LDL sehr ähnlich und somit auch die Zusammensetzung. Diese Erkenntnis deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen anderer

Forschungsgruppen¹⁰⁰. Anhand der chemischen Verschiebung konnte man darauf schließen, dass LDL im Vergleich zu humanem LDL etwas größer ist und in einer sehr einheitlichen Größe vorliegt³⁵. Lediglich die Zusammensetzung variiert leicht. Die Intensität des Cholin-Signals variiert etwas stärker und spaltet für einige Subfraktionen in zwei Signale auf. Dies kann durch ein unterschiedliches Verhältnis von Phosphoglyceriden zu Sphingomyelin in der Membran bedingt sein^{67, 113} oder durch lokale Anhäufungen von wechselwirkenden Lipiden, wie es in humanem LDL bei freiem Cholesterin mit Sphingomyelin der Fall ist¹¹⁻¹².

Die Linien sind in bovinem LDL etwas schmaler, woraus man schließen kann, dass die funktionellen Gruppen nicht in so vielen differenzierten Umgebungen vorliegen. Zusätzlich scheint eine höhere Beweglichkeit vorzuliegen, was man an der höheren Signalintensität der Cholesterin-Signale erkennen kann. Besonders hervorstechend sind die aufgespaltenen Signale der Methyl- und Methylen-Gruppen, die auf eine höhere Sichtbarkeit des Cholesterins in der Membran hindeuten könnten (siehe Struktur von LDL in Kapitel 4.2.1).

Bovines HDL, das ebenfalls durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert wurde, liegt in differenzierten Größen vor, wie sie auch in humanem Serum gefunden werden (siehe dazu auch Kapitel 4.4.1). Die Zusammensetzung der unterschiedlich großen Partikel variiert dabei nur wenig, wie Literaturangaben bestätigen¹⁰⁰. Im Kontrast zu humanem HDL sind jedoch die Signalintensitäten der CH₂- und Cholin-Kopfgruppen bei bovinem HDL geringer, was durch die Zusammensetzung erklärt werden kann. In bovinem HDL liegt etwa doppelt so viel Cholesterinester vor wie in humanem¹⁰⁰, so dass HDL eine ähnliche Zusammensetzung aufweist wie LDL. Die Linienbreite ist im Vergleich zu humanem HDL wiederum schmaler. Ebenso kann man signifikante Cholesterin-Signale deutlicher erkennen, was auf eine höhere Beweglichkeit und eine weniger komplexe Struktur schließen lässt, da nicht so viele verschiedene Frequenzen zu den einzelnen Signalen beitragen.



5.3 METHODIK DER LIPOPROTEINSEPARATION

5.3.1 ISOLIERUNG DER LIPOPROTEINE AUS SERUM

Bereits um 1950 stellten Lindgren et al. erste Ideen zur Isolierung spezifischer Lipoproteine aus menschlichem Serum mittels Ultrazentrifugation dar¹¹⁶⁻¹¹⁷. 1955 gelang dann Havel et al. eine präparative Isolierung der einzelnen Lipoproteinklassen mittels sequentieller Ultrazentrifugation in Lösungen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen für jeden einzelnen Trennschritt⁹. Diese Methode wird heute noch standardmäßig verwendet, wie auch in dieser Arbeit zur Bereitstellung aller Lipoproteine, die anschließend untersucht oder weiter subfraktioniert wurden. Der Vorteil dabei ist, dass keine Verdünnung der Proben entsteht, allerdings sind die Partikel während dem Trennvorgang enormen Kräften und hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt⁹⁰. Ein erheblicher Nachteil ist zudem der Zeitfaktor. Für einen kompletten Trenndurchgang muss man eine ganze Woche kalkulieren, da jeder Zentrifugationsschritt etwa 24 h Zeit in Anspruch nimmt. Durch die Verwendung von Ausschwingrotoren können in Lösungen mit speziell präparierten Dichtegradienten jedoch bessere Trennleistungen erzielt werden^{39, 91-95}. Nach einer leicht abgewandelten Methode von Chapman et al. wurden so in Kapitel 4.4.2.1 Lipoproteine in nur einem einzigen Schritt über einen mehrstufigen Gradienten direkt aus Serum isoliert³⁹. Dazu war eine Zentrifugenlaufzeit von nur einmal 48 h nötig und es wurden nicht nur die Hauptklassen VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3, sowie die übrigen Serumproteine (LPDS) erhalten, sondern auch noch diverse Subfraktionen. Anhand der Kurvenform und der Verschiebung einiger Signalmaxima konnte eine Aussage über die Reinheit der Proben getroffen werden, die mit konventionell getrennten Lipoproteinen aus Kapitel 4.1.1 verglichen wurden. Obwohl die kleineren Partikel und LPDS wenig bis gar keine Kontamination aufwiesen, zeigten die größeren Partikel, also LDL, IDL und VLDL deutliche Verunreinigungen von anderen Lipoproteingrößen.

Die präparative Nutzung der Gelfiltration zur Separation von Lipoproteinen wurde in den 70er Jahren etabliert^{90, 96-99}. Die Gelfiltration ist eine vergleichsweise milde Methode mit einfacher Visualisierung, die hohe Ausbeuten liefert. Da die Proben dabei aber stark verdünnt werden, muss anschließend ein weiterer Schritt eingeplant werden, um die Proben wieder zu konzentrieren⁹⁰. Um gesamtes Serum zu fraktionieren, reicht die Trennleistung der erhältlichen Säulenmaterialien nicht aus. Da aber bereits

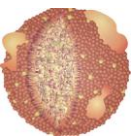
HDL-Partikel über eine Aneinanderreihung zweier verschiedener Gelfiltrations-Säulen aus Plasma isoliert werden konnte⁸⁸, wurde hier versucht durch das Hintereinanderschalten von drei, beziehungsweise fünf Säulen mit unterschiedlicher Porengröße eine Isolierung der Lipoproteinklassen zu erzielen. Die Aneinanderreihung von nur drei Säulen lieferte kein befriedigendes Ergebnis, da sämtliche Partikel kontaminiert waren. Mit fünf Gelfiltrations-Säulen war es hingegen möglich, eine durchaus respektable Trennleistung zu erzielen. Man konnte zwar sowohl in den großen als auch in den kleinen Partikeln Verunreinigungen durch andere Lipoproteinklassen erkennen, diese waren aber verhältnismäßig gering. Erstaunlicherweise konnten anhand der chemischen Verschiebung der Signale keine Fraktionen den Klassen VLDL und IDL zugewiesen werden, obwohl das Elutionsprofil diese eigentlich vermuten ließ. Die Ursache liegt vermutlich in der Konzentration der Proben, die auf die Trennung folgte.

Während durch die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation eine sehr gute Trennleistung für die kleinen Partikel, beziehungsweise solche hoher Dichte, erzielt wurden, dafür die weniger Dichten Partikel Kontaminationen aufwiesen, konnte mit Hilfe der Gelfiltration eine leichte Verunreinigung in kleinen und großen Partikeln detektiert werden. Eine gewisse Vorseparierung wäre bei letzterer Methode also durchaus sinnvoll. Ganz allgemein darf man nicht vergessen, dass die beiden Trennmethoden auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Während die Ultrazentrifugation nach Dichte separiert, nutzt die Gelfiltration geringe Größenunterschiede. Eine Korrelation von Dichte und Größe ist nur bedingt zu erwarten.

5.3.2 ISOLIERUNG VON HDL-SUBFRAKTIONEN

Wie bereits im vorigen Kapitel ausführlich diskutiert, ist eine Auftrennung von Lipoproteinklassen aber auch Subklassen sowohl mittels Ultrazentrifugation^{43, 82-87, 118} als auch Gelfiltration⁸⁸⁻⁸⁹ möglich.

In Kapitel 4.4.1 wurde ein Vergleich dieser Methoden am Beispiel von HDL beschrieben. Dazu wurden zuvor isoliertes HDL2 und HDL3 zum einen über einen Optiprep-Dichtegradienten separiert, zum anderen über eine Gelfiltrationssäule mit Superdex 200 prep grade. Die Gelelektrophorese zeigte für beide Trennmethoden eine zufriedenstellende Größenverteilung, die mit Hilfe des verwendeten Proteinstandards auf etwa 8-10 nm festgesetzt werden konnte. Die gelfiltrationsgetrennten Proben



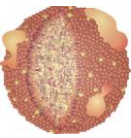
wiesen als einzige auch etwas kleinere Partikel bei 8 nm auf. Die generelle Größenverteilung liegt laut Literatur bei 5-12 nm¹⁴. Um vergleichbare Proben zu erhalten, wurden alle Subfraktionen in denselben Puffer bei identischem pH überführt und ihre Absorbanz auf 0.1 festgelegt, was Verdünnungseffekte vermeiden sollte.

Wie in Kapitel 4.4.1.1 detailliert beschrieben war der Einfluss der Konzentration im Bezug auf NMR-spektroskopische Untersuchungen nicht zu vernachlässigen, da für höhere Konzentrationen eine deutliche Tieffeldverschiebung in den Spektren zu erkennen war. Verschiebungen hin zu höheren Frequenzen können durch höhere Partikelgrößen hervorgerufen werden, was durch richtungsabhängige Suszeptibilitäten der Lipide in der Membran und im Kern erklärt werden kann³⁵. Eine Zusammenlagerung mehrerer Partikel in konzentrierten Lösungen würde also genau diesen Effekt hervorrufen, kann aber anhand der berechneten molaren Massen, die durch Diffusionsmessungen erhalten wurden, weitgehend ausgeschlossen werden. Die relativen Diffusionskoeffizienten von DSS und der markanten Signale im Spektrum nahmen zwar jeweils bei höherer Verdünnung zu, aber die Berechnung der molaren Masse aus dem Verhältnis zueinander lieferte wiederum relativ einheitliche Ergebnisse. Andererseits wäre es auch denkbar, dass die Partikel aufgrund ihrer räumlichen Nähe miteinander in Wechselwirkung treten und somit die chemische Verschiebung direkt beeinflusst wird. Die Absorbanz bei 460 nm verhielt sich proportional zur Konzentration der Proben, nicht aber die chemische Verschiebung. Mit Hilfe einer groben Abschätzung konnte die tatsächlich in Serum vorhandene Konzentration bestimmt werden, die allerdings so niedrig war, dass die Messdauer bei dieser Konzentration erheblich hätte verlängert werden müssen, um ein annehmbares Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Entsprechend wurde als sinnvoller Kompromiss eine mittlere Verdünnung gewählt, die einer Absorbanz von 0.1 entsprach, worauf alle HDL-Subklassen eingestellt wurden. Unterschiedliche pH-Werte von 6.0 bis 8.0 hatten mit Ausnahme einer kleinen Verschiebung des Cholin-Signals keinerlei Auswirkung. Die Phosphatgruppe des Lipid-Rückgrats, die sich zudem noch an der Oberfläche des Partikels befindet, hat vermutlich ähnlich wie Phosphorsäure einen pKa-Wert in der Nähe von 7.2¹¹⁹ und wird in dem untersuchten pH-Bereich einen entsprechenden Einfluss spüren.

Die Analyse der subfraktionierten HDL-Proben ergab schließlich, dass die Partikelseparation über Dichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration in mancher Hinsicht vergleichbar war, jedoch auch

Unterschiede aufwies. Durch beide Separationsmethoden erhielt man ganz klar eine kontinuierliche Größenverteilung. Die Verschiebung im Magnetfeld war für Proben aus der Ultrazentrifugation weiter gestreut als für gelfiltrationsgetrennte Proben und wies sogar teilweise Überschneidungen auf. Da die eine Methode nach der Größe separiert, die andere nach der Dichte, liegt die Vermutung nahe, dass mehrere Partikel mit derselben Größe und unterschiedlicher Dichte existieren oder umgekehrt. Wie oben schon erwähnt wird die chemische Verschiebung als Abhängigkeit von der Suszeptibilitäts-Anisotropie der Lipide in Membran und Kern angenommen³⁵. Wenn allein die Größe für die differierende Suszeptibilität in Partikelkern und Membran dafür ausschlaggebend wäre, würden die Subfraktionen aus der Gelfiltration einen größeren Frequenzbereich abdecken, was aber nicht der Fall ist. Es liegt also die Vermutung nahe, dass zudem ein Formfaktor eine Rolle spielt. Sollten Partikel nicht sphärisch, sondern diskoidal aufgebaut sein, würde das für den Fall einer freien Rotation der Partikel zu einer Linienverbreiterung führen¹²⁰. Tatsächlich sind die Methylsignale der tieffeld-verschobenen Spektren mit einer inhomogenen Linienbreite von ungefähr 30 Hz deutlich verbreitert im Vergleich zu den übrigen mit etwa 25 Hz. Diskoidale HDL-Partikel wurden in der Literatur schon mehrfach diskutiert¹²¹⁻¹²², hier könnte aber auch ein Artefakt der extremen Kräfte der Ultrazentrifugation eine gestauchte Form verursachen. Bei genauer Betrachtung ist zudem eine leichte Schulter der tieffeld-verschobenen Signale zu erkennen, die darauf hindeutet, dass sich noch Spuren von LDL in diesen Fraktionen befinden, was ebenso die entsprechende Verschiebung auslösen könnte. Die nachfolgenden Diffusionsberechnungen wurden anhand der Intensitäten der Signalmaxima durchgeführt, die von den Signalmaxima der LDL-Verunreinigung relativ weit entfernt sind. Der Einfluss sollte also minimal sein.

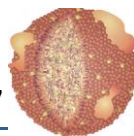
Mit Hilfe von Diffusionsmessungen wurden die molaren Massen und hydrodynamischen Radien der Partikel berechnet. Die molaren Massen der Partikel waren im Bezug auf die chemische Verschiebung in großen Bereichen für beide Separationsmethoden vergleichbar, jedoch wurden nach der Gelfiltration auch deutlich leichtere, und somit kleinere Partikel gefunden. Die ursprünglichen Proben HDL2 und HDL3 korrelierten dabei der chemischen Verschiebung entsprechend sehr schön mit den berechneten molaren Massen. Man muss im Allgemeinen jedoch bedenken, dass die Dichte der Partikel per Definition schon leicht verschieden ist, besonders in den Proben, die mittels Ultrazentrifugation getrennt wurden. Es wäre also eigentlich eine zusätzliche Korrektur nötig, um die



Massen exakt zu bestimmen. Die hydrodynamischen Radien wurden zu etwa 3-6 nm gefunden, was wiederum sehr gut zu den Erkenntnissen der gelelektrophoretischen Untersuchung passt und auch mit den Literaturwerten von 2.5-6 nm übereinstimmt¹⁴. Im Verhältnis zum hydrodynamischen Radius des DSS zeigten sie sehr ähnliches Verhalten wie die molaren Massen. Man findet demnach keine signifikant unterschiedlichen Dichten in den Subfraktionen.

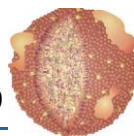
6 LITERATUR..

1. Rehner, G.; Daniel, H., Biochemie der Ernährung. *Spektrum Verlag* **2010**, 3. Auflage.
2. Krantz, S., Biochemie - GK 1. *Springer Verlag* **2007**, 1. Auflage.
3. Löffler, G.; Petrides, P. E.; Heinrich, P. C., Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag* **2007**, 8. Auflage.
4. Löffler, G., Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. *Springer Verlag* **2008**, 7. Auflage.
5. Schmidt, R. F.; Lang, F., Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. *Springer Verlag* **2007**, 30. Auflage.
6. Pindur, G.; Pindur, U., Klinische Chemie und serologische Laboratoriumsdiagnostik für Pharmazeuten und Mediziner. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* **1991**, 2. Auflage.
7. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P., Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer Verlag* **2008**, 6. Auflage.
8. Baltes, W., Lebensmittelchemie. *Springer Verlag* **2007**, 6. Auflage.
9. Havel, R. J.; Eder, H. A.; Bragdon, J. H., The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **1955**, 34, (9), 1345-53.
10. Olson, R. E., Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr* **1998**, 128, (2 Suppl), 439S-443S.
11. Hevonoja, T.; Pentikainen, M. O.; Hyvonen, M. T.; Kovanen, P. T.; Ala-Korpela, M., Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Bba-Mol Cell Biol L* **2000**, 1488, (3), 189-210.
12. Kumpula, L. S.; Kumpula, J. M.; Taskinen, M. R.; Jauhiainen, M.; Kaski, K.; Ala-Korpela, M., Reconsideration of hydrophobic lipid distributions in lipoprotein particles. *Chem Phys Lipids* **2008**, 155, (1), 57-62.
13. Hevonoja, T.; Pentikainen, M. O.; Hyvonen, M. T.; Kovanen, P. T.; Ala-Korpela, M., Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* **2000**, 1488, (3), 189-210.
14. Rifai, N.; Warnick, G. R.; Dominiczak, M. H., Handbook of Lipoprotein Testing. *Amer Assn for Clinical Chemistry* **2000**, 2nd edition.



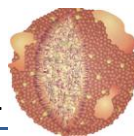
15. Olofsson, S. O.; Boren, J., Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* **2005**, 258, (5), 395-410.
 16. Olofsson, S. O.; Wiklund, O.; Boren, J., Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag* **2007**, 3, (4), 491-502.
 17. Rader, D. J.; Daugherty, A., Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* **2008**, 451, (7181), 904-13.
 18. Mead, J. R.; Irvine, S. A.; Ramji, D. P., Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)* **2002**, 80, (12), 753-69.
 19. Hoofnagle, A. F.; Heinecke, J. W., Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structures, and functions of lipoproteins. *J Lipid Res* **2009**.
 20. Qiu, X.; Mistry, A.; Ammirati, M. J.; Chrnyk, B. A.; Clark, R. W.; Cong, Y.; Culp, J. S.; Danley, D. E.; Freeman, T. B.; Geoghegan, K. F.; Griffor, M. C.; Hawrylik, S. J.; Hayward, C. M.; Hensley, P.; Hoth, L. R.; Karam, G. A.; Lira, M. E.; Lloyd, D. B.; McGrath, K. M.; Stutzman-Engwall, K. J.; Subashi, A. K.; Subashi, T. A.; Thompson, J. F.; Wang, I. K.; Zhao, H.; Seddon, A. P., Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* **2007**, 14, (2), 106-13.
 21. Glass, C. K.; Witztum, J. L., Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **2001**, 104, (4), 503-16.
 22. Lamarche, B.; Tchernof, A.; Moorjani, S.; Cantin, B.; Dagenais, G. R.; Lupien, P. J.; Despres, J. P., Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* **1997**, 95, (1), 69-75.
 23. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **1957**, 226, (1), 497-509.
 24. Srivastava, N. K.; Pradhan, S.; Mittal, B.; Gowda, G. A., High resolution NMR based analysis of serum lipids in Duchenne muscular dystrophy patients and its possible diagnostic significance. *NMR Biomed* **2010**, 23, (1), 13-22.
-

-
25. Parini, P.; Johansson, L.; Broijersen, A.; Angelin, B.; Rudling, M., Lipoprotein profiles in plasma and interstitial fluid analyzed with an automated gel-filtration system. *Eur J Clin Invest* **2006**, 36, (2), 98-104.
 26. Wiesner, P.; Leidl, K.; Boettcher, A.; Schmitz, G.; Liebisch, G., Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* **2009**, 50, (3), 574-85.
 27. Hidaka, H.; Hanyu, N.; Sugano, M.; Kawasaki, K.; Yamauchi, K.; Katsuyama, T., Analysis of human serum lipoprotein lipid composition using MALDI-TOF mass spectrometry. *Ann Clin Lab Sci* **2007**, 37, (3), 213-21.
 28. Gorler, A.; Kalbitzer, H. R., Relax, a flexible program for the back calculation of NOESY spectra based on complete-relaxation-matrix formalism. *J Magn Reson* **1997**, 124, (1), 177-88.
 29. Kremer, W.; Kalbitzer, H. R., Physiological conditions and practicality for protein nuclear magnetic resonance spectroscopy: experimental methodologies and theoretical background. *Methods Enzymol* **2001**, 339, 3-19.
 30. Gronwald, W.; Kalbitzer, H. R., Automated protein NMR structure determination in solution. *Methods Mol Biol* **2010**, 673, 95-127.
 31. Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C., Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod* **2005**, 68, (1), 133-49.
 32. Otvos, J. D.; Jeyarajah, E. J.; Bennett, D. W.; Krauss, R. M., Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem* **1992**, 38, (9), 1632-8.
 33. Ala-Korpela, M.; Korhonen, A.; Keisala, J.; Horkko, S.; Korpi, P.; Ingman, L. P.; Jokisaari, J.; Savolainen, M. J.; Kesaniemi, Y. A., ¹H NMR-based absolute quantitation of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma. *J Lipid Res* **1994**, 35, (12), 2292-304.
 34. Otvos, J. D.; Jeyarajah, E. J.; Bennett, D. W., Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* **1991**, 37, (3), 377-86.
 35. Lounila, J.; Ala-Korpela, M.; Jokisaari, J.; Savolainen, M. J.; Kesaniemi, Y. A., Effects of orientational order and particle size on the NMR line positions of lipoproteins. *Phys Rev Lett* **1994**, 72, (25), 4049-4052.
-



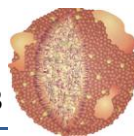
36. Freund, J.; Kalbitzer, H. R., Physiological Buffers for Nmr-Spectroscopy. *Journal of Biomolecular Nmr* **1995**, 5, (3), 321-322.
 37. Radding, C. M.; Steinberg, D., Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J Clin Invest* **1960**, 39, 1560-9.
 38. Baxter, G. P. W., C.C., Changes in volume upon solution in water of the halogen salts of the alkali metals. II. *J Am Chem Soc* **1916**, 38, (1), 70–105.
 39. Chapman, M. J.; Goldstein, S.; Lagrange, D.; Laplaud, P. M., A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* **1981**, 22, (2), 339-58.
 40. Li, X.; Donowitz, M., Fractionation of subcellular membrane vesicles of epithelial and nonepithelial cells by OptiPrep density gradient ultracentrifugation. *Methods Mol Biol* **2008**, 440, 97-110.
 41. Ford, T.; Graham, J.; Rickwood, D., Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* **1994**, 220, (2), 360-6.
 42. Sawle, A.; Higgins, M. K.; Olivant, M. P.; Higgins, J. A., A rapid single-step centrifugation method for determination of HDL, LDL, and VLDL cholesterol, and TG, and identification of predominant LDL subclass. *J Lipid Res* **2002**, 43, (2), 335-43.
 43. Davies, I. G.; Graham, J. M.; Griffin, B. A., Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. *Clin Chem* **2003**, 49, (11), 1865-72.
 44. Yee, M. S.; Pavitt, D. V.; Tan, T.; Venkatesan, S.; Godsland, I. F.; Richmond, W.; Johnston, D. G., Lipoprotein separation in a novel iodixanol density gradient, for composition, density, and phenotype analysis. *J Lipid Res* **2008**, 49, (6), 1364-71.
 45. Pradhan, S.; Srivastava, N. K.; Mittal, B.; Kumar, R.; Gowda, G. A. N., An improved, single step standardized method of lipid extraction from human skeletal muscle tissue. *Anal Lett* **2006**, 39, (2), 297-315.
 46. Levitt, M. H., Spin Dynamics. *Wiley* **2008**, 2nd edition.
 47. Munte, C. E.; Gade, G.; Domogalla, B.; Kremer, W.; Kellner, R.; Kalbitzer, H. R., C-mannosylation in the hypertrehalosaemic hormone from the stick insect *Carausius morosus*. *FEBS J* **2008**, 275, (6), 1163-73.
-

-
48. Robinson, G. W.; Cho, C. H.; Urquidi, J.; Singh, S., Thermal offset viscosities of liquid H₂O, D₂O, and T₂O. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, (11), 1991-1994.
 49. Mills, R., Self-Diffusion in Normal and Heavy-Water in Range 1-45 Degrees. *J Phys Chem-US* **1973**, 77, (5), 685-688.
 50. Yamada, H., Pressure-Resisting Glass Cell for High-Pressure, High-Resolution Nmr Measurement. *Review of Scientific Instruments* **1974**, 45, (5), 640-642.
 51. Hakumaki, J. M.; Kauppinen, R. A., ¹H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci* **2000**, 25, (8), 357-62.
 52. Chapman, D.; Leslie, R. B.; Hirz, R.; Scanu, A. M., High-resolution NMR spectra of high-density serum lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1969**, 176, (3), 524-36.
 53. Beckwith-Hall, B. M.; Thompson, N. A.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E., A metabonomic investigation of hepatotoxicity using diffusion-edited ¹H NMR spectroscopy of blood serum. *Analyst* **2003**, 128, (7), 814-8.
 54. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **1959**, 37, (8), 911-7.
 55. Casu, M.; Anderson, G. J.; Choi, G.; Gibbons, W. A., Nmr Lipid Profiles of Cells, Tissues and Body-Fluids .1. 1d and 2d Proton Nmr of Lipids from Rat-Liver. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1991**, 29, (6), 594-602.
 56. Choi, G. T. Y.; Casu, M.; Gibbons, W. A., Nmr Lipid Profiles of Cells, Tissues and Body-Fluids - Neutral, Nonacidic and Acidic Phospholipid Analysis of Bond Elut Chromatographic Fractions. *Biochemical Journal* **1993**, 290, 717-721.
 57. Subramanian, A.; Shankar Joshi, B.; Roy, A. D.; Roy, R.; Gupta, V.; Dang, R. S., NMR spectroscopic identification of cholesterol esters, plasmalogen and phenolic glycolipids as fingerprint markers of human intracranial tuberculomas. *NMR Biomed* **2008**, 21, (3), 272-88.
 58. Kriat, M.; Vion-Dury, J.; Confort-Gouny, S.; Favre, R.; Viout, P.; Sciaky, M.; Sari, H.; Cozzzone, P. J., Analysis of plasma lipids by NMR spectroscopy: application to modifications induced by malignant tumors. *J Lipid Res* **1993**, 34, (6), 1009-19.
 59. Ren, G.; Rudenko, G.; Ludtke, S. J.; Deisenhofer, J.; Chiu, W.; Pownall, H. J., Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on cryoEM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, (3), 1059-64.
-



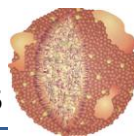
60. van Antwerpen, R.; La Belle, M.; Navratilova, E.; Krauss, R. M., Structural heterogeneity of apoB-containing serum lipoproteins visualized using cryo-electron microscopy. *J Lipid Res* **1999**, 40, (10), 1827-36.
 61. Lund-Katz, S.; Phillips, M. C., Packing of cholesterol molecules in human high-density lipoproteins. *Biochemistry* **1984**, 23, (6), 1130-8.
 62. Lund-Katz, S.; Phillips, M. C., Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein. *Biochemistry* **1986**, 25, (7), 1562-8.
 63. Sears, B.; Deckelbaum, R. J.; Janiak, M. J.; Shipley, G. G.; Small, D. M., Temperature-dependent ¹³C nuclear magnetic resonance studies of human serum low density lipoproteins. *Biochemistry* **1976**, 15, (19), 4151-7.
 64. Deckelbaum, R. J.; Shipley, G. G.; Small, D. M.; Lees, R. S.; George, P. K., Thermal transitions in human plasma low density lipoproteins. *Science* **1975**, 190, (4212), 392-4.
 65. Deckelbaum, R. J.; Shipley, G. G.; Small, D. M., Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. *J Biol Chem* **1977**, 252, (2), 744-54.
 66. Ala-Korpela, M.; Oja, J.; Lounila, J.; Jokisaari, J.; Savolainen, M. J.; Kesaniemi, Y. A., Structural changes of Lipoprotein Lipids by 1H-NMR. *Chem Phys Lett* **1995**, 242, (1-2), 95-100.
 67. Murphy, H. C.; Raoof, A.; White, J. J.; Ala-Korpela, M.; Bell, J. D.; Barnard, M. L.; Iles, R. A., Phospholipid headgroup mobility in low density lipoproteins. *Biochem Soc Trans* **1997**, 25, (1), 22S.
 68. Lipari, G.; Szabo, A., Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104, (17), 4546-4559.
 69. Lipari, G.; Szabo, A., Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .2. Analysis of Experimental Results. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104, (17), 4559-4570.
 70. Hamilton, J. A.; Small, D. M.; Parks, J. S., 1H NMR studies of lymph chylomicra and very low density lipoproteins from nonhuman primates. *J Biol Chem* **1983**, 258, (2), 1172-9.
 71. Foxall, P. J.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, L. C.; Neild, G. H.; Nicholson, J. K., 750 MHz 1H-NMR spectroscopy of human blood plasma. *J Pharm Biomed Anal* **1993**, 11, (4-5), 267-76.
-

-
72. Tukiainen, T.; Tynkkynen, T.; Makinen, V. P.; Jylanki, P.; Kangas, A.; Hokkanen, J.; Vehtari, A.; Grohn, O.; Hallikainen, M.; Soininen, H.; Kivipelto, M.; Groop, P. H.; Kaski, K.; Laatikainen, R.; Soininen, P.; Pirttila, T.; Ala-Korpela, M., A multi-metabolite analysis of serum by ^1H NMR spectroscopy: early systemic signs of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, 375, (3), 356-61.
 73. Parks, J. S.; Hauser, H., Low density lipoprotein particle size and core cholesteryl ester physical state affect the proton NMR magnetic environment of fatty acid methylene and methyl nuclei. *J Lipid Res* **1996**, 37, (6), 1289-97.
 74. Inoue, K.; Maurer, T.; Yamada, H.; Herrmann, C.; Horn, G.; Kalbitzer, H. R.; Akasaka, K., High-pressure NMR study of the complex of a GTPase Rap1A with its effector RalGDS. A conformational switch in RalGDS revealed from non-linear pressure shifts. *FEBS Lett* **2001**, 506, (3), 180-4.
 75. Kalbitzer, H. R.; Spoerner, M.; Ganser, P.; Hozsa, C.; Kremer, W., Fundamental link between folding states and functional states of proteins. *J Am Chem Soc* **2009**, 131, (46), 16714-9.
 76. Kremer, W.; Kachel, N.; Kuwata, K.; Akasaka, K.; Kalbitzer, H. R., Species-specific differences in the intermediate states of human and Syrian hamster prion protein detected by high pressure NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **2007**, 282, (31), 22689-98.
 77. Kachel, N.; Kremer, W.; Zahn, R.; Kalbitzer, H. R., Observation of intermediate states of the human prion protein by high pressure NMR spectroscopy. *BMC Struct Biol* **2006**, 6, 16.
 78. Akasaka, K.; Li, H.; Dubovskii, P.; Kalbitzer, H. R.; Yamada, H., High Resolution High-Pressure NMR Spectroscopy - Application to Protein Structure, Dynamics and Folding. *IOS Press* **2001**, 1st edition.
 79. Segrest, J. P.; Jones, M. K.; De Loof, H.; Dashti, N., Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* **2001**, 42, (9), 1346-67.
 80. Segrest, J. P.; Jones, M. K.; Klon, A. E.; Sheldahl, C. J.; Hellinger, M.; De Loof, H.; Harvey, S. C., A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem* **1999**, 274, (45), 31755-8.
 81. Cushley, R. J.; Okon, M., NMR studies of lipoprotein structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2002**, 31, 177-206.
-



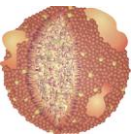
82. Griffin, B. A.; Caslake, M. J.; Yip, B.; Tait, G. W.; Packard, C. J.; Shepherd, J., Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* **1990**, 83, (1), 59-67.
 83. Shen, M. M.; Krauss, R. M.; Lindgren, F. T.; Forte, T. M., Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *J Lipid Res* **1981**, 22, (2), 236-44.
 84. Lossow, W. J.; Lindgren, F. T.; Murchio, J. C.; Stevens, G. R.; Jensen, L. C., Particle size and protein content of six fractions of the Sf 20 plasma lipoproteins isolated by density gradient centrifugation. *J Lipid Res* **1969**, 10, (1), 68-76.
 85. Lindgren, F. T.; Jensen, L. C.; Wills, R. D.; Stevens, G. R., Subfractionation of S f 4-10 5 , S f 4-20 and high density lipoproteins. *Lipids* **1972**, 7, (3), 194-201.
 86. Oncley, J. L.; Walton, K. W. C., D.G., A Rapid Method for the Bulk Isolation of beta-Lipoproteins from Human Plasma. *J Am Chem Soc* **1957**, 79, 4666-71.
 87. Swinkels, D. W.; Hak-Lemmers, H. L.; Demacker, P. N., Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low density lipoprotein subfractions. *J Lipid Res* **1987**, 28, (10), 1233-9.
 88. Nanjee, M. N.; Brinton, E. A., Very small apolipoprotein A-I-containing particles from human plasma: isolation and quantification by high-performance size-exclusion chromatography. *Clin Chem* **2000**, 46, (2), 207-23.
 89. Sata, T.; Havel, R. J.; Jones, A. L., Characterization of Subfractions of Triglyceride-Rich Lipoproteins Separated by Gel Chromatography from Blood-Plasma of Normolipemic and Hyperlipemic Humans. *Journal of Lipid Research* **1972**, 13, (6), 757-&.
 90. Rudel, L. L.; Marzetta, C. A.; Johnson, F. L., Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration. *Methods Enzymol* **1986**, 129, 45-57.
 91. Redgrave, T. G.; Roberts, D. C.; West, C. E., Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem* **1975**, 65, (1-2), 42-9.
 92. Foreman, J. R.; Karlin, J. B.; Edelstein, C.; Juhn, D. J.; Rubenstein, A. H.; Scanu, A. M., Fractionation of human serum lipoproteins by single-spin gradient ultracentrifugation: quantification of apolipoproteins B and A-1 and lipid components. *J Lipid Res* **1977**, 18, (6), 759-67.
-

-
93. Terpstra, A. H.; Woodward, C. J.; Sanchez-Muniz, F. J., Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal Biochem* **1981**, 111, (1), 149-57.
 94. Graham, J. M.; Higgins, J. A.; Gillott, T.; Taylor, T.; Wilkinson, J.; Ford, T.; Billington, D., A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. *Atherosclerosis* **1996**, 124, (1), 125-35.
 95. Terpstra, A. H. M.; Pels, A. E., Isolation of Plasma-Lipoproteins by a Combination of Differential and Density Gradient Ultracentrifugation. *Fresen Z Anal Chem* **1988**, 330, (2), 149-151.
 96. Rudel, L. L.; Lee, J. A.; Morris, M. D.; Felts, J. M., Characterization of plasma lipoproteins separated and purified by agarose-column chromatography. *Biochem J* **1974**, 139, (1), 89-95.
 97. Rudel, L. L.; Pitts, L. L.; Nelson, C. A., Characterization of Plasma Low-Density Lipoproteins of Nonhuman-Primates Fed Dietary Cholesterol. *Journal of Lipid Research* **1977**, 18, (2), 211-222.
 98. Sata, T.; Estrich, D. L.; Wood, P. D.; Kinsell, L. W., Evaluation of gel chromatography for plasma lipoprotein fractionation. *J Lipid Res* **1970**, 11, (4), 331-40.
 99. Margolis, S., Separation and size determination of human serum lipoproteins by agarose gel filtration. *J Lipid Res* **1967**, 8, (5), 501-7.
 100. Chapman, M. J., Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res* **1980**, 21, (7), 789-853.
 101. Dyrby, M.; Petersen, M.; Whittaker, A. K.; Lambert, L.; Norgaard, L.; Bro, R.; Engelsen, S. B., Analysis of lipoproteins using 2D diffusion-edited NMR spectroscopy and multi-way chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 531, (2), 209-216.
 102. Skipski, V. P.; Barclay, M.; Barclay, R. K.; Fetzer, V. A.; Good, J. J.; Archibald, F. M., Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J* **1967**, 104, (2), 340-52.
 103. Evans, J. D.; Waldron, J. M.; Oleksyshyn, N. L.; Riemenschneider, R. W., Polyunsaturated fatty acids in normal human blood. *J Biol Chem* **1956**, 218, (1), 255-9.
 104. Eisenberg, S.; Chajek, T.; Deckelbaum, R., Molecular aspects of lipoproteins interconversion. *Pharmacol Res Commun* **1978**, 10, (8), 729-38.
-



105. Kroon, P. A., The order-disorder transition of the core cholesteryl esters of human plasma low density lipoprotein. A proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* **1981**, 256, (11), 5332-9.
 106. Atkinson, D.; Deckelbaum, R. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G., Structure of human plasma low-density lipoproteins: molecular organization of the central core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, 74, (3), 1042-6.
 107. Deckelbaum, R. J.; Tall, A. R.; Small, D. M., Interaction of cholesterol ester and triglyceride in human plasma very low density lipoprotein. *J Lipid Res* **1977**, 18, (2), 164-8.
 108. Schroeder, F.; Goh, E. H., Regulation of very low density lipoprotein interior core lipid physicochemical properties. *J Biol Chem* **1979**, 254, (7), 2464-70.
 109. Kroon, P. A.; Krieger, M., The Mobility of Cholesteryl Esters in Native and Reconstituted Low-Density Lipoprotein as Monitored by Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256, (11), 5340-5344.
 110. Pregetter, M.; Prassl, R.; Schuster, B.; Kriechbaum, M.; Nigon, F.; Chapman, J.; Laggner, P., Microphase separation in low density lipoproteins - Evidence for a fluid triglyceride core below the lipid melting transition. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, (3), 1334-1341.
 111. Ginsburg, G. S.; Small, D. M.; Atkinson, D., Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem* **1982**, 257, (14), 8216-27.
 112. Finer, E. G.; Henry, R.; Leslie, R. B.; Robertson, R. N., NMR studies of pig low- and high-density serum lipoproteins. Molecular motions and morphology. *Biochim Biophys Acta* **1975**, 380, (2), 320-7.
 113. Murphy, H. C.; Ala-Korpela, M.; White, J. J.; Raoof, A.; Bell, J. D.; Barnard, M. L.; Burns, S. P.; Iles, R. A., Evidence for distinct behaviour of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, 234, (3), 733-7.
 114. Soininen, P.; Oorni, K.; Maaheimo, H.; Laatikainen, R.; Kovanen, P. T.; Kaski, K.; Ala-Korpela, M., ¹H NMR at 800 MHz facilitates detailed phospholipid follow-up during atherogenic modifications in low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 360, (1), 290-4.
 115. Tall, A. R.; Deckelbaum, R. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G., Thermal behavior of human plasma high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1977**, 487, (1), 145-33.
-

-
116. Gofman, J. W.; Lindgren, F. T.; Elliott, H., Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* **1949**, 179, (2), 973-9.
 117. Lindgren, F. T.; Elliott, H. A.; Gofman, J. W., The ultracentrifugal characterization and isolation of human blood lipids and lipoproteins, with applications to the study of atherosclerosis. *J Phys Colloid Chem* **1951**, 55, (1), 80-93.
 118. Groot, P. H.; Scheek, L. M.; Havekes, L.; van Noort, W. L.; van't Hooft, F. M., A one-step separation of human serum high density lipoproteins 2 and 3 by rate-zonal density gradient ultracentrifugation in a swinging bucket rotor. *J Lipid Res* **1982**, 23, (9), 1342-53.
 119. Qiang, Z.; Adams, C., Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* **2004**, 38, (12), 2874-90.
 120. Kuchel, P. W.; Bulliman, B. T., Perturbation of homogeneous magnetic fields by isolated single and confocal spheroids. Implications for NMR spectroscopy of cells. *NMR Biomed* **1989**, 2, (4), 151-60.
 121. Barter, P. J.; Rye, K. A., Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* **1996**, 7, (2), 82-7.
 122. Hamilton, R. L.; Williams, M. C.; Fielding, C. J.; Havel, R. J., Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J Clin Invest* **1976**, 58, (3), 667-80.
-



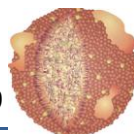
7 ANHANG

7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

C	Cholesterin
CE	Cholesterinester
CM	Chylomikon
DG-UZ	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation
DSS	4,4-Dimethyl-4-Silapentan-1-Sulfonsäure
GF	Gelfiltration
H2	HDL2
H3	HDL3
HDL	High Density Lipoproteine
IDL	Intermediate Density Lipoproteine
KG	Kopfgruppe
LDL	Low Density Lipoproteine
LPDS	Serum ohne Lipoproteine (Lipoprotein deficiency serum)
nc_proc	TOPSPIN-interner Skalierungsfaktor
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NS	Number of Scans
PL	Phospholipid
PLA	Plasmalogen
R	Rest (Fettsäurerest in Molekülen)
RG	Receiver Gain
SM	Sphingomyelin
SPH	Sphingosin
TG	Triacylglycerid
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

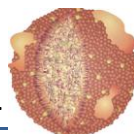
7.2 CHEMISCHE VERSCHIEBUNG ALLER SIGNALE NACH EXTRAKTION AUS KAPITEL 4.1.2

Chemische Verschiebung [ppm]	Substanz	Chemische Bindung	Position
0.6949	C	CH ₃	C-18
0.6974	CE	CH ₃	C-18
0.8635	C / CE	CH ₃	C-26, C-27
0.8681	C / CE	CH ₃	C-26, C-27
0.8747	C / CE / FS	CH ₃	C-26, C-27 / FS-CH ₃
0.8790	C / CE / FS	CH ₃	C-26, C-27 / FS-CH ₃
0.8871	FS	CH ₃	FS-CH ₃
0.8996	FS	CH ₃	FS-CH ₃
0.9110	FS	CH ₃	FS-CH ₃
0.9229	C / CE	CH ₃	C-21
0.9337	C / CE	CH ₃	C-21
0.9438	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
0.9547	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
0.9667	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
0.9733	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
0.9813	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
0.9920	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
1.0013	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
1.0090	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
1.0125	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
1.0177	C	CH ₃	C-19
1.0236	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
1.0295	C / CE	CH, CH ₂	C-9, C-14, C-22
1.0406	CE	CH ₃	C-19
1.0523	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.0616	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.0711	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.0816	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.0920	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1021	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1104	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1199	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1286	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1349	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1452	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24



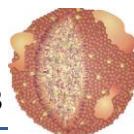
1.1535	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1677	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1770	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1873	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.1996	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.2090	C / CE	CH, CH ₂	C-1, C-12, C-15, C-17, C-23, C-24
1.2674	FS / C / CE	CH, CH ₂	FS-CH ₂ / C-16, C-20, C-22, C-23
1.2808	FS / C / CE	CH, CH ₂	FS-CH ₂ / C-16, C-20, C-22, C-23
1.2929	FS / C / CE	CH, CH ₂	FS-CH ₂ / C-16, C-20, C-22, C-23
1.3070	FS / C / CE	CH, CH ₂	FS-CH ₂ / C-16, C-20, C-22, C-23
1.3202	FS / C / CE	CH, CH ₂	FS-CH ₂ / C-16, C-20, C-22, C-23
1.3427	C / CE / FS	CH, CH ₂	C-16, C-20, C-22, C-23 / FS-CH ₂
1.3528	C / CE / FS	CH, CH ₂	C-16, C-20, C-22, C-23 / FS-CH ₂
1.3654	C / CE / FS	CH, CH ₂	C-16, C-20, C-22, C-23 / FS-CH ₂
1.3777	C / CE / FS	CH, CH ₂	C-16, C-20, C-22, C-23 / FS-CH ₂
1.4052	C / CE / FS	CH, CH ₂	C-16, C-20, C-22, C-23 / FS-CH ₂
1.4471	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.4516	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.4638	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.4818	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.4910	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.5148	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.5262	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.5368	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.5478	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.5599	C / CE	CH, CH ₂	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25
1.5797	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH ₂ -COO	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25 / FS-CH ₂
1.5849	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH ₂ -COO	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25 / FS-CH ₂
1.6049	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH ₂ -COO	C-7, C-8, C-11, C-15, C-25 / FS-CH ₂
1.6233	FS	CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
1.6352	FS	CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
1.67-1.78	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
1.8171	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8278	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8337	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8444	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8547	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8672	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8750	C / CE	CH ₂	C-1, C-2, C-16
1.8804	CE	CH ₂	C-2

1.8967	CE	CH ₂	C-2
1.9028	CE	CH ₂	C-2
1.9152	CE	CH ₂	C-2
1.9428	Verunreinigung		
1.9644	C / CE	CH ₂	C-7, C-12
1.9734	C / CE	CH ₂	C-7, C-12
1.9807	C / CE	CH ₂	C-7, C-12
2.0034	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH=CH	C-7, C-12 / FS-CH ₂
2.0192	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH=CH	C-7, C-12 / FS-CH ₂
2.0262	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH=CH	C-7, C-12 / FS-CH ₂
2.0407	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -CH=CH	C-7, C-12 / FS-CH ₂
2.0555	Verunreinigung		
2.0673	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.0770	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.0993	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.1266	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.1383	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.1662	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.1798	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.1923	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.2028	C	CH ₂	C-4
2.2043	Verunreinigung		
2.2262	C	CH ₂	C-4
2.2388	C	CH ₂	C-4
2.2431	C	CH ₂	C-4
2.2471	C	CH ₂	C-4
2.2505	C	CH ₂	C-4
2.2542	C	CH ₂	C-4
2.2602	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.2620	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.2716	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.2776	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.2826	C / CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.2950	CE / FS	CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.3072	CE / FS	CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.3188	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3275	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3295	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3323	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3386	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂



2.3417	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3450	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3496	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3518	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3574	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3586	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.3620	CE / FS	CH ₂ / CH ₂ -COO	C-4, FS-CH ₂
2.4125	FS	CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -COO	FS-CH ₂
2.6725	Verunreinigung		
2.7688	FS	CH=CH-CH ₂ -CH=CH	FS-CH ₂
2.7800	FS	CH=CH-CH ₂ -CH=CH	FS-CH ₂
2.7916	FS	CH=CH-CH ₂ -CH=CH	FS-CH ₂
2.8147	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
2.8231	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
2.8341	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
2.8411	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
2.8514	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
2.8607	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
2.8682	FS	CH=CH-(CH ₂ -CH=CH-) _x	FS-CH ₂
3.0919	PE	CH ₂	PE-2'
3.1026	PE	CH ₂	PE-2'
3.1099	PE	CH ₂	PE-2'
3.2140	SM	N ⁺ (CH ₃) ₃	SM-CH ₃
3.2246	PC	N ⁺ (CH ₃) ₃	PC-CH ₃
3.4402	C / MeOH	CHOH	C-3
3.4485	C / MeOH	CHOH	C-3
3.4590	C / MeOH	CHOH	C-3
3.4669	C / MeOH	CHOH	C-3
3.4748	C / MeOH	CHOH	C-3
3.4853	C / MeOH	CHOH	C-3
3.4936	C / MeOH	CHOH	C-3
3.5974	Cholin	CH ₂	PC-2'
3.6038	Cholin	CH ₂	PC-2'
3.6125	Cholin	CH ₂	PC-2'
3.7616	PI	CH	PI-6'
3.7772	PI	CH	PI-6'
3.7938	PI	CH	PI-6'
3.8684	KG		PLA-1 ^d ,1 ^u , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.8727	KG		PLA-1 ^d ,1 ^u , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.8791	KG		PLA-1 ^d ,1 ^u , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'

3.8847	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.8907	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.8963	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9015	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9118	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9174	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9251	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9316	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9389	KG		PLA-1 ^{d,1u} , CAR-1',2',3', SPH-2,3 ^u , PI,1'
3.9932	KG	CH ₂	PLA-3, PC-3, PE-3
4.0038	KG	CH ₂	PLA-3, PC-3, PE-3
4.0139	KG	CH ₂	PLA-3, PC-3, PE-3
4.0620	Verunreinigung		
4.1467	KG		PI-1 ^u , PC-1 ^u , PE-1 ^u , PI-1', TG-1 ^u , DG-1 ^u , SPH-3 ^d
4.1579	KG		PI-1 ^u , PC-1 ^u , PE-1 ^u , PI-1', TG-1 ^u , DG-1 ^u , SPH-3 ^d
4.1672	KG		PI-1 ^u , PC-1 ^u , PE-1 ^u , PI-1', TG-1 ^u , DG-1 ^u , SPH-3 ^d
4.1778	KG		PI-1 ^u , PC-1 ^u , PE-1 ^u , PI-1', TG-1 ^u , DG-1 ^u , SPH-3 ^d
4.1871	KG		PI-1 ^u , PC-1 ^u , PE-1 ^u , PI-1', TG-1 ^u , DG-1 ^u , SPH-3 ^d
4.2511	Cholin	CH ₂	PC-1'
4.3243	TG	CH ₂	TG-1 ^d
4.3310	TG	CH ₂	TG-1 ^d
4.3439	TG / DG	CH ₂	TG-1 ^d , DG-1 ^d
4.3508	TG / DG	CH ₂	TG-1 ^d , DG-1 ^d
4.3615	PLA	-CH ₂ -CH=CH-O-	PLA-b
4.3713	PLA	-CH ₂ -CH=CH-O-	PLA-b
4.4156	KG	CH ₂	PC-1 ^d , PE-1 ^d , PI-1 ^d
4.4206	KG	CH ₂	PC-1 ^d , PE-1 ^d , PI-1 ^d
4.4354	KG	CH ₂	PC-1 ^d , PE-1 ^d , PI-1 ^d
4.4407	KG	CH ₂	PC-1 ^d , PE-1 ^d , PI-1 ^d
4.5716	CE / MeOH	CHOR	C-3
4.5788	CE / MeOH	CHOR	C-3
4.5898	CE / MeOH	CHOR	C-3
4.5993	CE / MeOH	CHOR	C-3
4.6078	CE / MeOH	CHOR	C-3
4.6169	CE / MeOH	CHOR	C-3
4.6260	CE / MeOH	CHOR	C-3
5.2225	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2279	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2324	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2374	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2



5.2431	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2485	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2521	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2577	KG	CH	PC-2, PE-2, PI-2
5.2764	TG	CH	TG-2
5.2845	TG	CH	TG-2
5.2925	TG	CH	TG-2
5.3086	FS	CH=CH	FS-CH
5.3205	FS	CH=CH	FS-CH
5.3268	FS	CH=CH	FS-CH
5.3389	C / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.3448	C / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.3494	C / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.3543	C / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.3625	FS	CH=CH	FS-CH
5.3680	FS	CH=CH	FS-CH
5.3780	CE / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.3848	CE / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.3923	CE / FS	CH, CH=CH	C-6, FS-CH
5.4049	FS	CH=CH	FS-CH
5.4423	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-a
5.4550	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-a
5.4683	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-a
5.6887	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-b
5.7011	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-b
5.7129	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-b
5.7259	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-b
5.7383	SM	-CH ₂ -CH=CH-CHOH-	SPH-b
5.9181	PLA	-CH ₂ -CH=CH-O-	PLA-a
5.9279	PLA	-CH ₂ -CH=CH-O-	PLA-a

Tab. 7.1 Chemische Verschiebung aller Signale nach Extraktion; C = Cholesterin, CE = Cholesterinester, FS = Fettsäure, PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PI = Phosphatidylinositol, SM = Sphingomyelin, SPH = Sphingosin, CAR = Cardiolipin, KG = Kopfgruppe, TG = Triacylglyceride, DG = Diacylglyceride, PLA = Plasmalogen

7.3 MATLAB-QUELLCODES

7.3.1 KOMPONENTENANALYSE AUS KAPITEL 4.1.1

```

newread=1; % 1 if new data import, 0 otherwise
if newread==1
    clear;
    path='C:\Dokumente und Einstellungen\...\';
    pathsave=[path 'backup\'];
    file1='110622_UZ-Trennung4_';
    p=[107 207 307 407 507 607 707 1000 1100 1300 1400 1500];
    file2='.txt';
    headline=1; % number of headlines in ASCII-file

% region of interest and interpolation
f1p=3.27; % LEFT limit
f2p=0.4; % RIGHT limit
numpoints=5000; % number of points within region of interest

'Import spectra and interpolate'
for j=1:size(p,2)
    clear number amp hz ppm;
    [number amp hz ppm]=textread([path file1 sprintf('%d',p(j)) file2],...
        '%f, %f, %f, %f','headerlines',1);
    amp=amp./1000000;

    PPM=[f2p:(f1p-f2p)/(numpoints-1):f1p]; PPM=fliplr(PPM); %new ppm scale
    AMP(j,:)=interp1(ppm(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),... %interpolate amp
        amp(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),PPM);
    AMP(j,1)=amp(find(ppm<f1p,1));
    [j size(p,2)]
    pause(0.01);
end
end

for i=1:size(p,2)
    A(i,:)=sum(AMP(i,:));
    AMP(i,:)=AMP(i,:)./A(i,:);
end

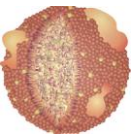
AMP(find(isnan(AMP))==1)=0;

SERUM=AMP(1,:);
SS=AMP([2:size(p,2)],:);
[RESULT,resnorm,residual,exitflag]=lsqnonneg(SS',SERUM');

RESULT=RESULT';

for i=1:size(RESULT,2)
    M(i,:)=SS(i,:).*RESULT(i);
end

```



7.3.2 BERECHNUNG DER T_1 -ZEITEN AUS KAPITEL 4.1.2

```

newread=1; % 1 if new data import, 0 otherwise
if newread==1
    clear;
    path='C:\Dokumente und Einstellungen\...\';
    file1='100929_Serumextraktion_T1_';
    p=[1001:1019];
    file2='.txt';
    headline=0; % number of headlines in ASCII-file

% import spectra and interpolate
    flp=6 % left limit
    f2p=0.5 % right limit
    numpoints=3000 % number of points within the region of interest

    for j=1:size(p,2)
        clear number amp hz ppm;
        [number amp hz ppm]=textread([path file1 sprintf('%d',p(j)) file2],...
            '%f, %f, %f, %f','headerlines',headline);

        if size(ppm,1)>128000
            for i=1:size(ppm,1)
                ppm(i)=ppm(i)+0.00001*mod(i,10);
            end
        end

        PPM=[f2p:((flp-f2p)/(numpoints-1)):flp]; PPM=fliplr(PPM); %new ppm scale
        AMP(j,:)=interp1(ppm(find(ppm<flp,1):find(ppm<f2p,1)),... %interpolate amp
            amp(find(ppm<flp,1):find(ppm<f2p,1)),PPM);
        AMP(j,1)=amp(find(ppm<flp,1));

        [j size(p,2)] % shows process
        pause(0.01); % shows process
    end
    AMP=-AMP;
end

vd=[0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 1.2 1.5 1.8 2.0 2.5 3.0 4.0 5.0];

% fitting
fitstring='Meq*(1-(1-cos(pi/180*a))*exp(-t/T1))';
ftype=fitttype(fitstring,'ind','t','coeff',{'Meq','T1','a'});
for n=1:size(AMP,2)
    opts=fitoptions('method','NonlinearLeastSquares','Robust','On', ...
        'Lower',[0 0 0],'Upper',[abs(100*max(AMP(:,n))) 50 360],'Startpoint',
        [AMP(size(AMP,1),n) 2 180],...
        'MaxIter',10000, 'MaxFunEvals', 1000);
    %,'Display','iter');
    fresult=fit(vd',AMP(:,n),ftype,opts);
    f(:,n)=feval(fresult,vd');
    fitresults(n,:)=coeffvalues(fresult);
    ci(n,:,:) = confint(fresult); % confidence bounds
    [n size(AMP,2)] % shows process
    pause(0.01); % shows process
end

```

7.3.3 FITTEN DES DIFFUSIONSABFALLS AUS KAPITEL 4.4.1

```

newread=1; % 1 if new data import, 0 otherwise
if newread==1
    clear;
    path='C:\Dokumente und Einstellungen\...\';
    pathsave=[path 'backup\'];
    file1='BAD_005_09_S01_';
    p=[1001:1018];
    file2='.txt';
    headline=0; % number of headlines in ASCII-file

sens=0.1 % sensitivity of fit

% region of interest and interpolation
f1p=5.5; % LEFT limit
f2p=-0.5; % RIGHT limit
numpoints=3000; % number of points within region of interest

for j=1:size(p,2)
    clear number amp hz ppm;
    [number amp hz ppm]=textread([path file1 sprintf('%d',p(j)) file2],...
        '%f, %f, %f, %f','headerlines',headline);

    if size(ppm,1)>128000
        for i=1:size(ppm,1)
            ppm(i)=ppm(i)+0.00001*mod(i,10);
        end
    end

    PPM=[f2p:(f1p-f2p)/(numpoints-1):f1p]; PPM=fliplr(PPM); %new ppm scale
    AMP(j,:)=interp1(ppm(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),... %interpolate amp
        amp(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),PPM);
    AMP(j,1)=amp(find(ppm<f1p,1));

    [j size(p,2)] % shows process
    pause(0.01); % shows process
end
AMP=AMP./max(max(AMP));
end

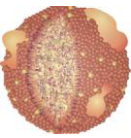
grad=[0.05:0.05:0.90]; % gradient strength relative to max. gradient
gradpulse=0.004; % gradient pulse(s) in sec (2*p30)
gradshapefac=0.9563; % gradient pulse shape factor (diff.100)
maxgrad=0.546/gradshapefac; % max gradient strength in T/m (600MHz)
Delta=0.1; % Diffusion time (d20)
gamma=42576400*2*pi;
tau=0.0002; % d16
b=(gamma^2*gradpulse^2*gradshapefac^2*maxgrad^2*(Delta-gradpulse/3-tau/2))/1e10;

% fitting

[pks,locs]=findpeaks(AMP(1,:), 'minpeakheight',sens); % finds maxima

for i=1:size(locs,2)

```

```

AMP2(:,i)=AMP(:,locs(1,i))
end

for j=1:size(locs,2)
    AMP3(:,j)=AMP2(:,j)/max(AMP2(:,j));
end

fitstring=sprintf('base+mult*exp(-D*%f*grad^2)',b);
ftype=fitttype(fitstring,'ind','grad','coeff',{'base','mult','D'});
for n=1:size(locs,2)
    opts=fitoptions('method','NonlinearLeastSquares',...
        'Lower',[-0.3 0 1e-2],'Upper',[0.3 1.4 1e+1],'Startpoint',[0.0001 11e-
        1],...
        'MaxIter',1000,'MaxFunEvals',1000);
    fresult=fit(grad',AMP3(:,n),ftype,opts);
    f(:,n)=feval(fresult,grad');
    fitresults(n,:)=coeffvalues(fresult);
    ci(n,:,:) = confint(fresult);
    [n size(AMP3,2)] % confidence bounds
    pause(0.01);    % shows process
    % shows process
end

% Diffusion coefficient (factor 1e10 in b, due to fitting procedure has to be
corrected!)

Diffcoeff=fitresults(:,3)/1e10;

% Mass calculation

for k=1:size(locs,2)-1
    Mass(k,1)=196.34*(Diffcoeff(size(locs,2),1)/Diffcoeff(k,1))^3;
end

```

7.3.4 FITTEN DES DIFFUSIONSABFALLS FÜR DEFINIERTE DIFFUSIONS KONSTANTEN AUS KAPITEL 4.1.4

```

newread=1; % 1 if new data import, 0 otherwise
if newread==1
    clear;
    path='C:\Dokumente und Einstellungen\...\';
    pathsave=[path 'backup\'];
    file1='\110622_UZ-Trennung4_';
    p=[1001:1018];
    file2='.txt';
    headline=0; % number of headlines in ASCII-file

    % region of interest and interpolation
    flp=5.5; % LEFT limit
    f2p=0.5; % RIGHT limit
    numpoints=5000; % number of points within region of interest

    'Import spectra and interpolate'
    for j=1:size(p,2)
        clear number amp hz ppm;
        [number amp hz ppm]=textread([path file1 sprintf('%d',p(j)) file2],...

```

```

        '%f, %f, %f, %f', 'headerlines', 1);
    amp=amp./1000000;

    PPM=[f2p: ((f1p-f2p)/(numpoints-1)):f1p]; PPM=fliplr(PPM); %new ppm scale
    AMP(j,:)=interp1(ppm(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),... %interpolate amp
        amp(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)), PPM);
    AMP(j,1)=amp(find(ppm<f1p,1));
    [j size(p,2)]
    pause(0.01);
end
AMP=AMP./max(max(AMP));
end

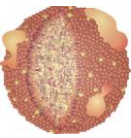
% DOSY parameters
grad=[0.05:0.05:0.90]; % gradient strength relative to max. gradient
gradpulse=0.008; % gradient pulse(s) in sec (2*p30)
gradshapefac=0.9563; % gradient pulse shape factor (diff.100)
maxgrad=0.546/gradshapefac; % max gradient strength in T/m (600MHz)
Delta=0.05; % Diffusion time (d20)
gamma=42576400*2*pi;
tau=0.0002; % d16
b=(gamma^2*gradpulse^2*gradshapefac^2*maxgrad^2*(Delta-gradpulse/3-tau/2))/1e10;

clear num fitD D Dlower Dupper fitamp amplitude amplower ampupper
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
many =7; % how many components
num = [1:many];
Dmax =0.8746;
Dmin =0.0998;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
fitD =zeros(size(num));
fitamp =ones(size(num));
amplitude =ones(size(num))./size(num,2); % rel. start values for amplitudes
amplower =zeros(size(num)); % rel. lower limits
ampupper =ones(size(num)); % rel. upper limits
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

D=[10 0.8746 0.6261 0.5246 0.2213 0.1460 0.0998]; % diffcoeff from separate
calculation

'Fit preparation'
k=1;
clear coefD coeffcell lower upper start coefa
for i=1:size(num,2)
    if fitD(i)==1
        coefD{i}12.89=sprintf('D%02d',i);
        coeffcell{k}=coefD{i};
        lower(k)=Dlower(i);
        upper(k)=Dupper(i);
        start(k)=D(i);
        k=k+1;
    else
        coefD{i}=sprintf('%e',D(i));
    end
end
for i=1:size(num,2)
    if fitamp(i)==1

```



```

        coefa{i}=sprintf('a%02d',i);
        coeffcell{k}=coefa{i};
        lower(k)=amplower(i);
        upper(k)=ampupper(i);
        start(k)=amplitude(i);
        k=k+1;
    else
        coefa{i}=sprintf('%f',amplitude(i));
    end
end
clear fitstring
fitstring='';
for i=1:size(num,2)
    fitstring=[fitstring '+' coefa{i} '*exp(-' coefD{i} '*' sprintf('%f',b)
'*x^2)'];
end

ftype=fitttype(fitstring, 'ind','x','coeff',coeffcell);

'Fitting'
clear fresult f fitresults ci resD resa
for j=1:size(AMP,2)
    opts=foptions('method', 'NonlinearLeastSquares',...
'Lower', lower.*abs(AMP(1,j)), 'Upper', upper.*abs(AMP(1,j)), 'Startpoint',
start.*abs(AMP(1,j)),...
'MaxIter',100, 'MaxFunEvals', 1000);
fresult=fit(grad', AMP(:,j),ftype,opts);
f(:,j)=feval(fresult,grad');
fitresults(j,:)=coeffvalues(fresult);
ci(j,,:) = confint(fresult);
[j size(AMP,2)]
end
if isempty(find(fitD==1))==0 % extract resulting D's
    for i=1:size(find(fitD==1),2)
        resD(:,i)=fitresults(:,i);
        cilowerD(:,i)=ci(:,1,i);
        ciupperD(:,i)=ci(:,2,i);
    end
end
if isempty(find(fitamp==1))==0 % extract resulting amplitudes
    for i=1:size(find(fitamp==1),2)
        resa(:,i)=fitresults(:,i+size(find(fitD==1),2));
        cilowera(:,i)=ci(:,1,i+size(find(fitD==1),2));
        ciuppera(:,i)=ci(:,2,i+size(find(fitD==1),2));
    end
end

for i=1:max(num)
    newname(i)={sprintf('%1.1e',D(i)./1e10)};
end

```

7.3.5 BERECHNUNG DER T₂-ZEITEN AUS KAPITEL 4.2

```

path1='C:\Dokumente und Einstellungen\...\';
path2=[283 293 303 310 313 323];
file1='\110622_UZ-Trennung4_';
p=[1001:1010];

```

```

file2='.txt';
headline=0;           % number of headlines in ASCII-file

% nc_proc correction

B1=[8,16,1,1,1,1;8,16,1,1,1,0.5;8,16,1,1,1,0.5;4,8,1,1,1,1;2,4,1,1,1,1;1,4,1,1,1,1;
1,2,1,1,1,1;1,2,1,1,1,1;1,1,1,1,1,1;1,1,1,1,1,1;];
B2=ones(10,6);

B=B2;   % choose B1 for serum!!!

% import spectra and interpolate
f1p=3.5      % left limit
f2p=0.5      % right limit
numpoints=1000 % number of points within the region of interest

AMP2=zeros(size(p,2),numpoints*size(path2,2));

for l=1:size(path2,2)
    for j=1:size(p,2)
        clear number amp hz ppm;
        [number amp hz ppm]=textread([path1 sprintf('%d',path2(l)) file1
        sprintf('%d',p(j)) file2],...
        '%f, %f, %f, %f','headerlines',headline);
        PPM=[f2p:((f1p-f2p)/(numpoints-1)):f1p]; PPM=fliplr(PPM); %new ppm scale
        AMP(j,:)=interp1(ppm(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),... %interpolate amp
        amp(find(ppm<f1p,1):find(ppm<f2p,1)),PPM);
        AMP(j,1)=amp(find(ppm<f1p,1));

        AMP2(j,(l-1)*numpoints+(1:numpoints))=AMP(j,:).*B(j,1);

        [j size(p,2)]           % shows process
        pause(0.01);           % shows process
    end
end

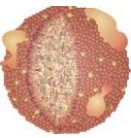
for j=1:numpoints*size(path2,2)
    AMP3(:,j)=AMP2(:,j)./max(AMP2(:,j));
end

% loop values
vc=[2 4 8 16 32 64 80 104 128 256];

% t=2*d20*loop
d20=500;    %µs
vt=vc*2*d20/1000;

% fitting
fitstring='Mxy*exp(-t/T2)';
ftype=fitttype(fitstring,'ind','t','coeff',{'Mxy','T2'});
);
fitresults=zeros(size(AMP2,2),2);
f=zeros(size(vt,2),size(AMP2,2));
ci=zeros(size(AMP2,2),2,2);

```



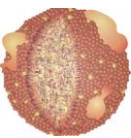
```
for n=1:size(AMP3,2)
    if AMP2(1,n)>5e6
        opts=fitoptions('method','NonlinearLeastSquares',... %'Robust','On', ...
            'Lower',[0 0],'Upper',[2 2000],'Startpoint',[1 50],...
            'MaxIter',10000,'MaxFunEvals',1000);
        fresult=fit(vt',AMP3(:,n),ftype,opts);
        f(:,n)=feval(fresult,vt');
        fitresults(n,:)=coeffvalues(fresult);
        ci(n,,:) = confint(fresult);
        [n size(AMP2,2)]
        pause(0.01);
    end
end
```

% confidence bounds
% shows process
% shows process

8 DANKSAGUNG...

Zu guter Letzt möchte ich allen danken, die mir in den vier Jahren meiner Doktorarbeit zur Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank gilt allen Korrekturlesern und denen, die es versucht haben, sowie den tapferen Zählern der Elektronenmikroskopie-Aufnahmen. Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei...

- ◆ Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die interessante und flexible Themenstellung und die Freiheit, meine eigenen Ideen zu verwirklichen. Außerdem möchte ich ihm für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die aufschlussreichen Diskussionen gerade zum Ende der Arbeit hin danken.
 - ◆ Prof. Dr. Werner Kremer, der mir nicht nur sein Blut sondern auch seinen Computer zur Verfügung gestellt hat, ohne den viele Berechnungen heute noch laufen würden. Ich danke ihm auch für die Unterstützung und seine immerzu freundliche und geduldige Art.
 - ◆ Dr. Fritz Huber für die gewinnbringende Zusammenarbeit mit der Firma LipoFit und die Einführung in die Welt des Programmierens.
 - ◆ Dr. Christina Schreier, die mir gerade zu Beginn meiner Arbeit eine große Hilfe war und mir den Umgang mit den Spektrometern und einigen Laborgeräten beigebracht hat.
 - ◆ Dr. Renate Kirchhöfer, Christiane Proll und natürlich Thomas Müller, der mir mit Tee und Keks manchen Arbeitstag versüßt hat.
 - ◆ Prof. Dr. med. Gerd Schmitz, der mir als Leiter des Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik am Universitätsklinikum Regensburg die Zusammenarbeit ermöglicht hat.
 - ◆ Dr. Alfred Böttcher für die Einblicke in die klinischen Analysen. Vor allem danke ich ihm, dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und sich von seiner Arbeit immer noch nicht trennen konnte.
-



- ◆ Dr. Reinhard Rachel, der sich immer viel Zeit für die elektronenmikroskopischen Messungen und Analysen meiner Proben genommen hat und mir bei der Bestimmung der Größenverteilung eine große Hilfe war.
- ◆ PD Dr. Dr. Cornelia C. Metges vom Forschungsinstitut für Biologie Landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf für den netten Kontakt und die Bereitstellung der bovinen Lipoproteine.
- ◆ Dr. Paul Ramm für die selbstlose Unterstützung beim Programmieren und anderen physikalischen Herausforderungen. Danke auch für die zahlreichen Teepausen und Frischlufttrunden. „Ohne dich hätte ich es nie so weit gebracht!“
- ◆ Jörg Köhler und Markus Beck-Erlach für den Beistand unter hohem Druck.
- ◆ Dörte Repenning-Rochelt für ihre Durchsetzungsfähigkeit und die Hilfe mit gewichtigen Geräten.
- ◆ Ingrid Kulbartz, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und sich gewissenhaft um meine Finanzierung gekümmert hat.
- ◆ Sandra Kreitner für die wunderbare Büroatmosphäre und ihre aufrichtige Freundschaft. „Du warst immer eine treibende Kraft für mich!“
- ◆ Marisa Barbosa de Aguiar por um maravilhoso ambiente no escritório e pelo conhecimento da comida brasileira. „Você é uma pessoa muito encantadora!“
- ◆ Maren Eberhardt für die letzten Wochen und dafür, dass sie stets ihre eigene Meinung hat, Kristina Lobenhofer, die sich immer dafür interessiert, wie es mir geht, Raphael Kreitner für die kleinen Vergnüglichkeiten während dem Arbeitsalltag, Tanja Meierhofer für ihren Elan, Johannes Hiltl für Comics, wo man sie nicht erwarten würde, Malte Andrasch für die schnellste Blutanalyse aller Zeiten und natürlich allen übrigen Lehrstuhlmitgliedern und Ehemaligen. „Ich habe mich bei euch mehr als wohl gefühlt!“

- ◆ Andreas Bogner für seine Freundschaft und dafür, dass er noch immer für mich da ist. ‚Du bist einfach der Größte!‘
 - ◆ Sabine Bösl für die 80er, 90er und 2000er. ‚Schön, dass es dich gibt, Mylady!‘
 - ◆ Andreas Neubauer für die Erfindung des KaTee und dafür, dass er mir so ähnlich ist, Dr. Christoph Beyer für eine andere Sicht auf die Dinge und seine Liebe zur Musik, Nathalie Strecker für ein bisschen mehr Farbe in meinem Leben, Christian Dittrich, der sich nie mit weniger als einem Anruf zufrieden gibt, CARO, caro, Sanne & Sonja dafür, dass die Chemie noch immer stimmt, Anna, Doreen, Jasmin & Sandra für ihre jahrelange Freundschaft, den Blockbustern und all meinen anderen Freunden, die mich zum Lachen bringen und mein Leben lebenswert machen.
 - ◆ meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und mich wieder auf den Boden der Tatsachen zurückholen. ‚Ihr habt mich zu dem gemacht, was ich heute bin!‘
 - ◆ meiner Schwester für den Bruder, der sie hätte sein können und dafür, dass es sie gibt.
-

